

糖尿病における糖の吸収と排泄  
に関する研究

足達哲也

糖尿病における糖の吸収と排泄  
に関する研究

足達哲也

## 目次

第1章 緒論	1
第2章 2型糖尿病モデルの OLETF ラットにおける小腸の糖質消化について —小腸二糖類水解酵素群のスクラーゼ、イソマルターゼの検討—	4
第2-1節 序論	4
第2-2節 材料および方法	5
第2-3節 結果	8
第2-4節 考察	16
第3章 糖尿病ラットの小腸における形態学的変化とスクラーゼ・イソ マルターゼの発現異常	18
第3-1節 序論	18
第3-2節 材料および方法	20
第3-3節 結果	25
第3-4節 考察	35
第4章 $\text{Na}^+$ -グルコース共輸送担体阻害剤 T-1095 によるストレプトゾ トシン誘導糖尿病ラットの高血糖抑制効果	37
第4-1節 序論	37
第4-2節 材料および方法	40
第4-3節 結果	44
第4-4節 考察	53
第5章 まとめ	57
謝辞	60
参考文献	61
論文別刷	

## 第1章 緒論

糖尿病は紀元前 1500 年の頃よりその記載があり、現在では代表的な生活習慣病として世界中で深刻な問題となっている。日本では急激なライフスタイルの変化にともなって急増している疾患である。糖尿病は遺伝素因のほかに運動不足や過食といったライフスタイルの変化のような環境因子が加わり発症する。正常人では食物摂取により血糖が上昇し、膵β細胞は血糖上昇を認識しインスリン分泌が促進される。インスリン作用により糖は各臓器にエネルギー源としてあるいは貯蔵のために取り込まれ、血糖は正常域に回復する。しかし、過食によって血糖を正常域に回復させるためのインスリン要求量が増加する結果、膵臓では膵β細胞では疲弊、細胞死がおこり、インスリン分泌不全が引き起こされる。また過剰分泌されたインスリンによって、肝臓、筋肉および脂肪などがインスリンに対して抵抗性を示し、各臓器での糖の取り込み能が低下する。インスリン分泌および作用不全の結果、糖代謝が破綻する[1, 2, 3]。また持続的高血糖により、末梢神経、眼、腎臓などに糖尿病性細小血管障害が現れる。

栄養素は生体の形成、エネルギー源および恒常性維持に必須である。食物が消化、吸収された後、栄養素は血中から各臓器へ運搬されエネルギー源として用いられる他、肝や筋あるいは脂肪組織で貯蔵される。栄養素のひとつである炭水化

物は生体のエネルギー源として不可欠である。食物より得られた炭水化物はまず口腔内のアミラーゼで消化された後、小腸の二糖類水解酵素( $\alpha$ -グルコシダーゼ)によって最終消化される。最終消化されて得られた単糖類は糖輸送担体を介して血中へ取り込まれる[4]。この最終消化に関与する酵素群は小腸刷子縁膜に結合して存在することから、小腸での消化機構は膜消化と呼ばれる[5]。炭水化物はこの膜消化によって単糖類にまで分解された後に吸収されることから、膜消化は血糖に直接影響すると考えられる。近年糖尿病患者における食後高血糖是正のために二糖類水解酵素および $\alpha$ -グルコシダーゼの阻害剤が汎用されている[6, 7]が、糖尿病における膜消化系の機構については未解決の問題が多い。そこで本論文第2章、第3章では二糖類水解酵素のひとつとして知られるスクラーゼ、イソマルターゼ[8, 9]についてとりあげ、糖尿病モデルラットを用いて、小腸機能のひとつである最終消化の役割を演じるスクラーゼ、イソマルターゼ活性について検討した。

腎臓は糖の再吸収能を有する臓器として重要である。糖尿病合併症のひとつである糖尿病性腎症では、腎は肥大化し、糸球体過剰濾過が検出される。またアルブミン尿、腎の組織変化も認められ、腎機能の低下を引き起こす[10]。糖尿病性腎症の原因のひとつが高血糖であり、正常な腎臓機能を保持するためには血糖のコントロールが必須である。本論文第4章では新規に開発された糖再吸収阻害剤を用いて、糖の再吸収を抑制し余剰の糖を尿中に排出することによって、薬剤が

血糖や腎機能および組織変化におよぼす影響を検討した。

本論文は上記に掲げた糖尿病における小腸と腎臓に関する研究についてまとめたものである。小腸では糖尿病における糖の膜消化機構と形態との関連性についての解明を、また腎臓に関しては糖の再吸収を抑制するという新しい考え方に基づいた薬剤を用いて、血糖や糖尿病性腎症で認められる腎機能および形態変化におよぼす影響を検討した。具体的な研究内容の概説は各章の「序論」に示した。

## 第2章 2型糖尿病モデルの OLETF ラットにおける小腸の糖質消化

について —小腸二糖類水解酵素群のスクラーゼ、イソマルターゼの検討—

### 第2-1節 序論

スクラーゼ、イソマルターゼは小腸の二糖類水解酵素として知られ、炭水化物の消化に重要な役割を演じる。この酵素は複合体を形成(SI複合体)し、小腸刷子縁膜に存在する[8, 9]。インスリン欠乏モデルであるストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病ラットにおいて二糖類水解酵素活性の上昇が報告されている[11, 12, 13, 14, 15]。しかしながら2型糖尿病での二糖類水解酵素発現について不明な点が多い。

Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF)ラットは2型糖尿病モデルラットとして大塚製薬徳島研究所で開発されたラットである[16]。OLETF雄ラットは自然発症的にインスリン抵抗性を有し高血糖となる[16]。そこで本章では2型糖尿病の進行に伴った糖消化酵素の活性発現機構を明らかにするべく、OLETF雄ラットのSIの活性および発現について検討した。

## 第2-2節 材料および方法

### 1 動物飼育

4週齢の OLETF 雄ラット(OLETF)と対照ラットである LETO 雄ラット(LETO)を大塚製薬徳島研究所より提供を受けた。SPF 施設で12時間の昼夜サイクル(昼は9:00~21:00、夜は21:00~9:00)、温度24℃、湿度55%で飼育した。飼料はCE-2 (Crea Japan, Japan)を用い、水は水道水を用いて、それぞれ自由摂取させた。

### 2 血糖、インスリン、トリグリセリドの測定

10、40 および48週齢の OLETF において1 g/kg 体重の耐糖能試験を行った。糖負荷後0、30、60 および120分後に尾静脈より採血し血糖値を測定した(Blood Glucose Test, Boehringer-Mannheim, Germany)。10、20、40 および48週齢の OLETF およびLETO より非絶食下で尾静脈より血液を採取し、随時血糖値(Blood Glucose Test, Boehringer-Mannheim, Germany)およびトリグリセリド値(Triglyceride G-Test Wako, Wako, Japan)を測定した。各ラットを16時間絶食しペントバルビタール麻酔後、心臓より採血し、遠心後血漿よりインスリン値を測定した(EIA Test Insulin II BMY, Boehringer-Mannheim, Germany)。標準としてラットインスリン(Cosmo Bio, Japan)を用いた。

### 3 スクララーゼ、イソマルターゼ活性測定

各ラットを16時間絶食し、ペントバルビタール麻酔後小腸を幽門より2 cmのところから5 cm摘出し、長さを三等分にした。このうち中央部を生理食塩水ですすいだ後、粘膜層を剥離した。この粘膜層を100 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 6.8)でホモジナイズし、3000 x gで遠心後上清を粗酵素液として用いた。スクラーゼ、イソマルターゼの活性は25 mMスクロース、イソマルトースを基質として、Dahlqvistの方法[17]にしたがって測定を行った。タンパク量の検定はBradfordの方法[18]にしたがって行った。活性値は粗酵素液中タンパク1 mg、1分あたりの基質分解量(mol)で表した。

### 4 イムノブロットティング

活性の測定に用いた粗酵素タンパク10 µgをLaemmliの方法[19]にしたがってSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、ポリビニリデンジフルオライド(PVDF)膜に転写した。転写した膜を調製した抗スクラーゼ、イソマルターゼ抗血清[15]で処理し、西洋わさびペルオキシダーゼの結合した二次抗体(Cosmo Bio, Japan)で処理した後、ペルオキシダーゼ検出キット(Wako Pure Chemical Industries, Japan)で検出した。バンドの濃淡はデンシトメーターにて定量化した。

### 5 ノーザンブロットティング

粘膜層からグアニジンイソチオシアネート法[20]によりトータル RNA を調製した。トータル RNA 20  $\mu\text{g}$  を 7% ホルムアルデヒド含有 1% アガロースゲルで電気泳動し、ナイロン膜(Hybond-N, Pharmacia Biotech, Switzerland)に転写した。ジゴシゲニン(DIG)でラベルしたスクラーゼ-イソマルターゼ[21]をコードする cRNA をプローブ(10 ng/ml)として、ハイブリダイズを行った。コントロールハイブリダイゼーションとして DIG ラベルの $\beta$ -Actin の cRNA (Boehringer-Manheim, Germany) を用いた。アルカリホスファターゼの結合した DIG 抗体で処理し、蛍光発色させた。バンドの濃淡はデンストメーターにて定量化した。

## 6 統計処理

統計的評価は 2-Way ANOVA を用いた。多変数解析は Duncan の多変数解析テストを用いた。データは mean  $\pm$  SEM を用い、 $P < 0.05$  をもって統計的有意差とした。

## 第2-3節 結果

### 1 体重、血糖、血中インスリンおよび血中トリグリセリド (Table 2-1)

体重は10、20 および40 週齢 OLETF において対照ラットである同週齢の LETO に比し有意に高値を示した。しかし、48 週齢 OLETF においては体重が  $523 \pm 14$  g となり、40 週齢 OLETF ( $730 \pm 14$  g) に比して有意な減少を示した。

随時血糖値は20 週齢までの OLETF において同週齢の LETO に比して有意ではないが高値の傾向を示した。40 週齢になると OLETF の血糖値は同週齢の LETO に比して有意に高値を示し、さらに48 週齢 OLETF では血糖値が  $44.6 \pm 6.4$  mM まで上昇し、40 週齢 OLETF ( $17.2 \pm 4.8$  mM) に比して著明な高血糖を呈した。

絶食時の血中インスリン値は20 週齢の OLETF で同週齢の LETO に比して有意に高値を示しインスリンの基礎分泌の亢進が認められた。しかし10、40 および48 週齢 OLETF のインスリン値は同週齢の LETO と有意な差を認めなかった。

また血中トリグリセリド値は40 および48 週齢の OLETF において同週齢の LETO に比し有意に高値を示した。

### 2 経口ブドウ糖負荷試験 (Fig. 2-1)

OLETF に対して経口グルコース負荷試験を行った。40 および48 週齢のグルコース負荷前血糖値は10 週齢に対して有意に高値を示した。また40 週齢においてグルコース負荷後、血糖値が10 週齢に対して有意に上昇した。しかしながらグ

ルコース負荷後 120 分では糖負荷前血糖値にまで回復した。これに対し、48 週齢ではグルコース負荷後に上昇した血糖が 120 分後でも糖負荷前血糖値に回復しなかった。

### 3 スクララーゼ、イソマルターゼの比活性 (Fig. 2-2)

次に OLETF の糖尿病の進行に伴う小腸刷子縁のスクラーゼおよびイソマルターゼの一定タンパク量あたりの比活性を検討した。10 週齢 OLETF のスクラーゼおよびイソマルターゼ活性は同週齢の LETO ラットとほぼ同活性を示した。また 40 週齢までは OLETF-LETO 間および週齢間に両活性とも差を認めなかった。しかしながら、48 週齢では OLETF は同週齢 LETO および 40 週齢以下の OLETF に比しスクラーゼおよびイソマルターゼ活性が有意に上昇し、活性値は約 2 倍となった。

### 4 スクララーゼ・イソマルターゼタンパクおよび mRNA 発現 (Fig. 2-3, 2-4)

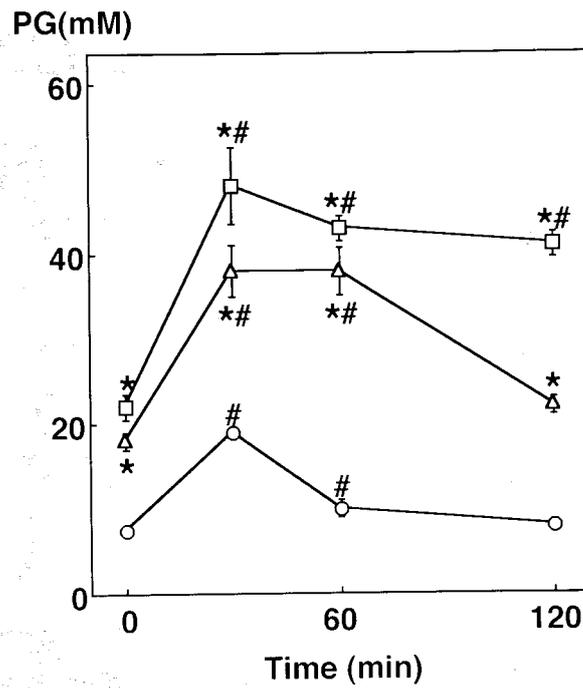
SI 複合体のスクラーゼ、イソマルターゼ各サブユニットの発現について、活性測定に用いた粗酵素液を SDS-PAGE 後 SI 複合体抗血清を用いてイムノブロットを行った。に示すように、48 週齢 OLETF ではスクラーゼ (分子量 120 kDa)、イソマルターゼ (分子量 140 kDa) [8, 9]の発現が同週齢の LETO に比して、また 40 週齢以下の OLETF に比して、有意に亢進していることが明らかとなった。さらに SI 複合体をコードする mRNA (6.0 kb)レベルをノーザンブロットで検討した

ところ、タンパク発現の結果と同様に、48 週齢 OLETf で同週齢の LETO に比して、また 40 週齢以下の OLETf に比して、有意に SI mRNA が高発現した。

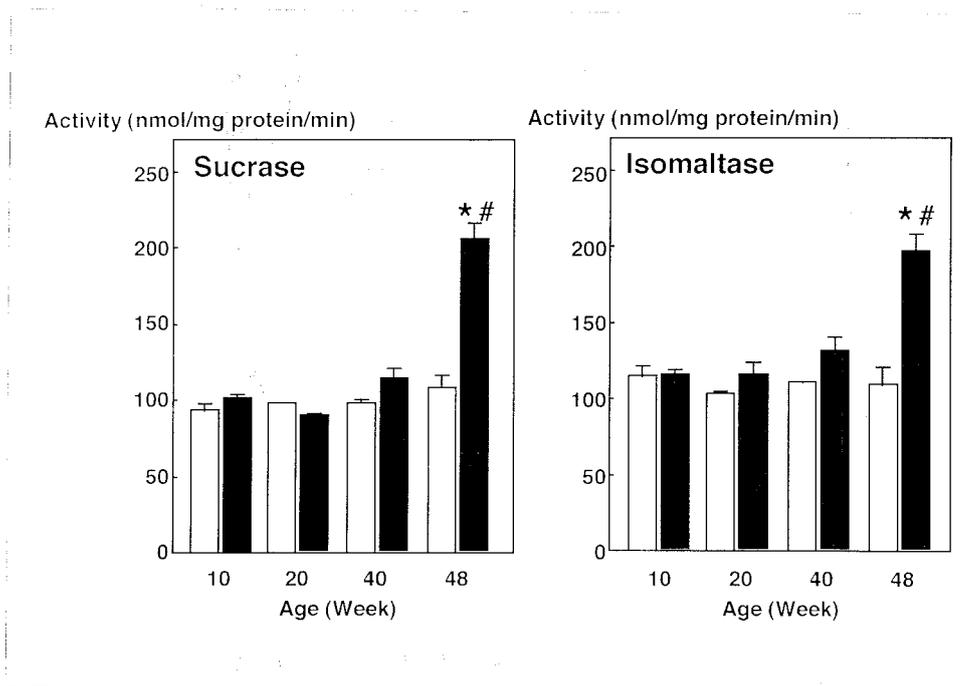
**Table 2-1** Body weight, plasma glucose, insulin and triglyceride levels in OLETF and LETO rats.

Strain/age	Body weight (g)	Plasma glucose (mM)	Plasma insulin (pM)	Plasma triglyceride (mM)
<b>LETO</b>				
10 week	261 ± 16	6.7 ± 0.8	109 ± 18	0.59 ± 0.28
20 week	435 ± 3	7.5 ± 1.1	121 ± 52	0.95 ± 0.11
40 week	480 ± 27	8.3 ± 2.3	96 ± 39	1.25 ± 0.07
48 week	518 ± 31	8.9 ± 1.5	119 ± 21	1.39 ± 0.31
<b>OLETF</b>				
10 week	339 ± 11*	8.9 ± 1.9	113 ± 35	1.15 ± 0.43
20 week	563 ± 32*	14.0 ± 2.4	257 ± 48*	1.62 ± 0.29
40 week	730 ± 14*	17.2 ± 4.8*	80 ± 32	3.33 ± 0.61*
48 week	523 ± 14	44.6 ± 6.4*	85 ± 56	2.69 ± 1.06*

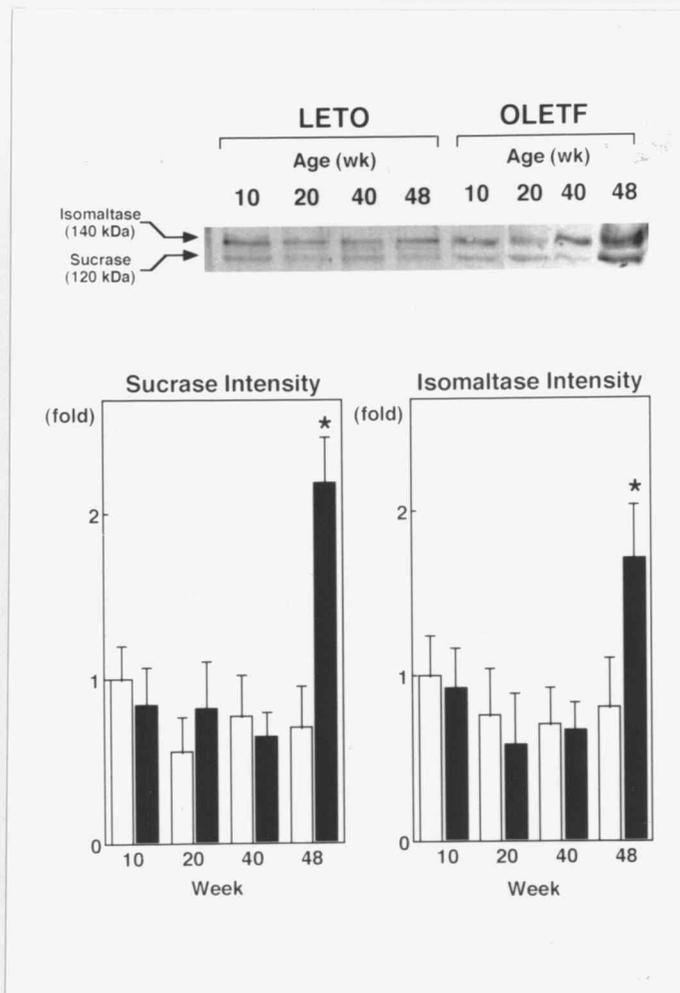
Plasma glucose, insulin, and triglyceride levels were determined as described in Section 2-2. Data are presented as means ± SEM. Each (n=5). \*P<0.05 compared with LETO rats at the corresponding age.



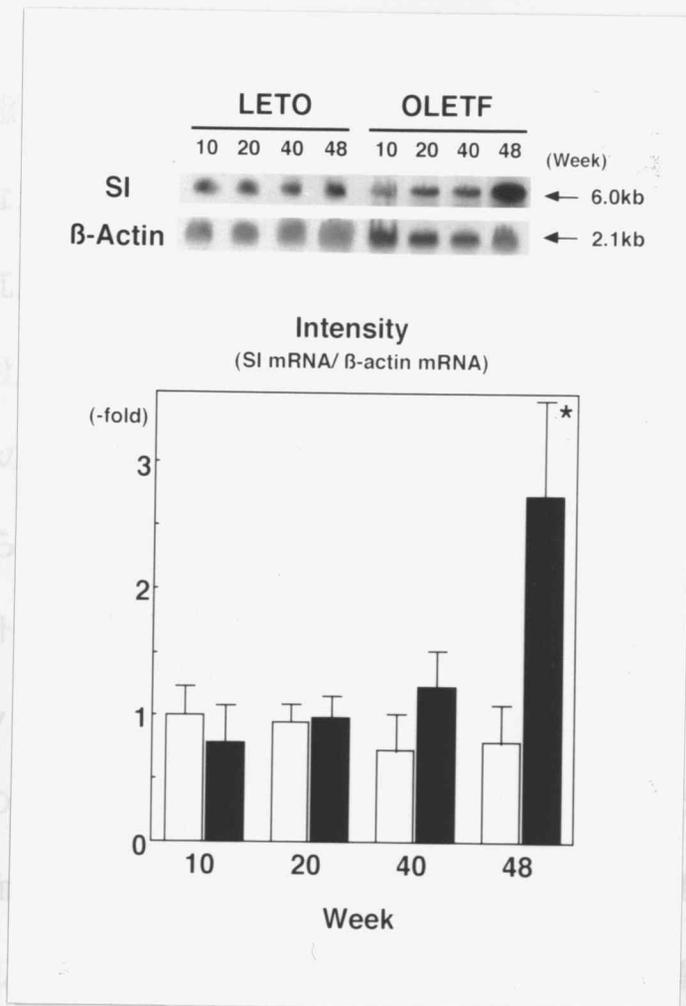
**Fig. 2-1** Glucose tolerance test in OLETF rats at different ages. Rats at 10 (○), 40 (△), or 48 (□) weeks of age, which had been fasted for 16 h, were given glucose (1 g/kg body weight) orally, and the plasma glucose level was followed after the administration of glucose. Data are presented as mean of four rats ( $\pm$  SEM). \* $P < 0.05$  compared with 10-week-old rats at the corresponding time point. # $P < 0.05$  compared with the corresponding preOGTT value.



**Fig. 2-2** Sucrase and isomaltase activities in the small intestine of OLETF and LETO rats at different ages. The activities of sucrase and isomaltase in LETO (open bars) and OLETF (solid bars) rats were determined as described in Section 2-2. Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n=5). \* $P < 0.05$  compared with 10-week-old rats in each strain. # $P < 0.05$  compared with LETO rats the corresponding age.



**Fig. 2-3** Western blot analysis of the SI complex in OLETF and LETO rats at different ages. The expression levels of the sucrase and isomaltase subunits of the SI complex were examined by immunoblotting using an antiserum against rat SI complex as described in Section 2-2. (A) Representative immunoblot showing the sucrase and isomaltase subunits in OLETF and LETO rats at different ages. (B) Immunoblots of the sucrase and isomaltase subunits are quantified by scanning densitometry. Data ( $n=5$ ,  $\pm$  SEM) are presented as relative values (fold of the level of 10-week-old LETO rats). \* $P < 0.05$  compared with 10-week-old rats in each strain. # $P < 0.05$  compared with LETO rats at the corresponding age.



**Fig. 2-4** Expression level of mRNA for the SI complex in OLETF and LETO rats at different ages. Northern blotting was done as described in Section 2-2. (A) Representative Northern blots showing mRNA for the SI complex. (B) Northern blots are quantified by scanning densitometry. Data ( $n=5$ ,  $\pm$  SEM) are normalized with  $\beta$ -actin mRNA level and are presented as relative values (fold of the level of 10-week-old LETO rats). \* $P < 0.05$  compared with 10-week-old rats in each strain. # $P < 0.05$  compared with LETO rats at the corresponding age.

## 第 2-4 節 考察

糖尿病状態において小腸粘膜の過形成および消化吸収亢進などの形態学的および機能的な変化が報告されている[22, 23, 24]。特に SI は STZ 誘発糖尿病ラットで発現の亢進が報告されている[15]。正常ラットにブドウ糖を注入したとき、血糖上昇に対応して小腸のスクラーゼ活性の誘導が認められたことから、糖尿病状態での SI の発現亢進は高血糖であるものと推察されていた[25]。しかしながら、本章より得られたデータでは、インスリン抵抗性を示し 2 型糖尿病モデルの OLETF ラットは若齢から高血糖を示すにも関わらず、SI 活性は 40 週齢まで対照の LETO ラットと同レベルであった(Table 2-1, Fig. 2-2, 2-3)。さらに Takenoshita らは腎からのグルコース再吸収阻害剤であるフロリジンを STZ 誘発糖尿病ラットに注射し血糖を正常化したにもかかわらずスクラーゼ活性は亢進したことを報告した[15]。これらのことから高血糖自体が SI の発現の亢進には直接関与しないと考えられる。

本章では、48 週齢 OLETF で同週齢の LETO に比してまた 40 週齢以下の OLETF に比して、SI が有意に高活性および高発現したことを明らかにした(Fig. 2-2, 2-3, 2-4)。48 週齢 OLETF では 40 週齢以下の OLETF に比して、随時血糖の著しい上昇が認められ、さらに 40 週齢 OLETF に比して体重減少が認められた(Table 1)。またこの 48 週齢 OLETF において、40 週齢 OLETF に比してインスリンの基礎分

泌に差を認めなかった(Table 1)が、糖負荷後に上昇した血糖が 120 分後でも回復を認めなかった(Fig. 2-1)。これらの結果から 48 週齢 OLETF では血糖低下に対するインスリンの分泌量の著明な低下が示唆され、このインスリン分泌低下によって 48 週齢 OLETF において SI 活性および発現の亢進が認められたと考えられる。Takenoshita らはインスリン欠乏である STZ 誘導糖尿病ラットをインスリン治療することで SI の発現が抑制されると報告した[15]。このことからインスリンが SI 遺伝子発現を制御する因子のひとつであることが示唆された。

2型糖尿病においてインスリン作用不全によるグルコース代謝異常が様々な組織で認められている[1]。OLETF においてもグルコース代謝異常に関していくつかの研究が行われている。16 週齢 OLETF で肝の糖代謝関連酵素の発現に異常が報告され、また 30 週齢 OLETF で骨格筋においてインスリン感受性糖輸送担体である GLUT4 の発現が低下していることも報告されている[26, 27]。OLETF は肝や筋では比較的若齢で異常を示すが、SI の活性発現異常は肝や筋での異常より遅れた週齢で認められた。OLETF では肝や筋での糖代謝異常により糖代謝の不全が悪化し、一方で膵 $\beta$ 細胞が疲弊することによってインスリン分泌の低下を招いた結果、SI 活性の亢進が起こると考えられる。このことから、インスリンが分泌能の低下した 2 型糖尿病患者において SI 活性の亢進が引き起こされる可能性が示唆された。

## 第3章 糖尿病ラットの小腸における形態学的変化とスクラーゼ・イソマルターゼの発現異常

### 第3-1節 序論

第2章において、Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF)ラットのスクラーゼ・イソマルターゼ(SI)の一定タンパク量あたりの比活性は若齢では対照のLong-Evans Tokushima Otsuka (LETO)ラットに比して差を認めなかったが、インスリンの高度な欠乏状態では対照に比して有意に高活性となることを明らかにした。また糖尿病モデル動物の実験において小腸絨毛の過形成が報告されている[28, 29, 30, 31]。しかしながら、糖尿病における小腸の形態学的変化と消化酵素であるSIの活性および発現との関連については未解決な問題が多い。

最近、小腸を含め腸の増殖および分化に転写因子 Cdx1 および Cdx2 が関与することが報告されてきた[32, 33, 34]。Cdx1 は小腸上皮の発生や再生に関与し[33]、Cdx2 は分化や SI の発現に関与すること[32, 34]が報告されている。このことから、糖尿病においてこれら転写因子の発現が小腸の形態学的変化や SI の発現に影響している可能性が考えられる。

そこで本章では糖尿病における小腸の形態変化を検討するとともに SI 発現との関係の解明を目的とした。3種類の糖尿病モデルラット、すなわちインスリン

欠乏糖尿病モデルの STZ ラット、2 型糖尿病モデルの OLETF ラット[16]および Goto-Kakizaki (GK)ラット[35]を用いて、糖尿病における小腸の形態学的変化、SI の活性および発現、さらに組織化学的に SI の発現について検討を行った。またこれら糖尿病モデルにおいて小腸に関連する転写因子 Cdx1 および Cdx2 の mRNA 発現もあわせて検討した。

## 第3-2節 材料および方法

### 1 糖尿病モデル動物と動物飼育

ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット(STZラット)は、清水実験動物で購入した7週齢 Wistar 雄ラットに体重 1 kg あたり 50 mg の STZ を含む 50 mM クエン酸ナトリウム(pH 4.5) 溶解液 100  $\mu$ l を腹腔内投与し2週間飼育したものをを用いた。対照ラットは 50 mM クエン酸ナトリウム(pH 4.5) 100  $\mu$ l のみを腹腔内投与したものをを用いた。OLETF および対照の LETO の雄ラットは大塚製薬徳島研究所より提供を受けた。各ラットとも 10 および 30 週齢まで飼育した。GK および対照の Wistar 雄ラットは日本クレアより購入し、各ラットとも 10 および 20 週齢まで飼育した。

それぞれのラットは 25 °C、12 時間の昼夜サイクル(昼 8:00~20:00、夜 20:00~8:00)で飼育した。飼料は CE-2 (Crea Japan, Japan)を、水は水道水をそれぞれのラットに自由摂食水させた。

### 2 血糖、インスリンおよびヘモグロビン A<sub>1c</sub>の測定

ラットをペントバルビタールで麻酔後開腹し、心臓より採血を行った。血糖値は酵素法で測定した(Glucose-B Test Wako, Wako Pure Chemical Industries, Japan)。血中インスリン値はラジオイムノアッセイ法で測定した。ヘモグロビン A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>)値はアフィニティークロマトグラフィー法で測定した(Glyc-Affin. Ghb,

Seikagaku Kogyo, Japan)。

### 3 小腸の摘出と組織切片の作製

小腸は幽門より 2 cm のところから 5 cm 摘出した。摘出した小腸を 2 等分した。幽門に近い方は氷冷したリン酸緩衝液(PBS)ですすいだ後液体窒素により瞬間凍結させ、酵素活性測定、イムノブロットおよびノーザンブロットを行うまで -80 °C で保存した。もう一方は 10 %ホルマリンで固定後パラフィンに包埋し、3 μm の切片を作製した。その切片をヘマトキシリン、エオシン(HE)染色を行い、各切片について絨毛長を 10 箇所測定した。また切片については以下に示す SI の免疫染色も行った。

### 4 腸粘膜タンパク量とスクラーゼ、イソマルターゼの比活性および総活性測定

幽門に近い方から 1 cm 長の小腸より粘膜を剥離し、1 ml の 10 mM リン酸カリウム緩衝液(pH6.8)中でホモジナイズし、3000 x g で遠心後上清を粗酵素液として用いた。腸粘膜タンパク量はその粗酵素液を Lowry 法[36]に従い測定し、単位は 1 cm あたりのタンパク mg 量として示した。

スクラーゼ、イソマルターゼの活性は 25 mM スクロース、イソマルトースを基質として、Dahlqvist の方法[17]にしたがって測定を行った。比活性値は粗酵素液中タンパク 1 mg、1 分あたりの基質分解量(mol)で、総活性値は小腸 1 cm、1 分あたりの基質分解量(mol)で表した。

## 5 イムノブロットティング

活性の測定に用いた粗酵素タンパク 10  $\mu\text{g}$  を Laemmli の方法[19]にしたがって SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、ポリビニリデンジフルオライド (PVDF) 膜に転写した。転写した膜を調製した抗スクラーゼ、イソマルターゼ抗血清で処理し、アルカリホスファターゼの結合した二次抗体(Cosmo Bio, Japan) で処理した。4-nitro tetrazolium chloride / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate 4-toluidine salt を用いて検出した。バンドの濃淡はデンシトメーターにて定量化した。

## 6 免疫組織化学

先に示したようにパラフィンで包埋した空腸の切片をイムノプロットで用いた SI 抗体で処理した後、ビオチン化二次抗体で処理、西洋わさびペルオキシダーゼの結合したアビジンで処理した[37]。3, 3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride で発色させた。発現の分布およびシグナル強度はデンシトメーターにて定量化した。

## 7 ノーザンブロットティング

各ラットの腸からトータル RNA を guanidinium thiocyanate cesium chloride 法[38, 39]により抽出した。各 20  $\mu\text{g}$  のトータル RNA を glyoxal-dimethyl sulfoxide で変性

し、1 %アガロースゲルで電気泳動後、20 x SSC (3 M NaCl, 300 mM *tri*-sodium citrate)下でナイロン膜(Hybond N, Amersham-Pharmacia Biotech, Sweden)に転写した。<sup>32</sup>P でラベルした SI (625 bp; 1810-2434 [21]) cDNA をキットを用いて合成し (Nick Translation Kit, Amersham-Pharmacia Biotech, Sweden)これをプローブとして用いた。10<sup>6</sup> count /分の量のプローブを含むハイブリダイゼーション緩衝液(50 % formamide、5 x SSC、10 % dextran sulfate sodium salt、0.25 % SDS、20 mM sodium phosphate (pH 7.0)、2 x Denhardt's reagent [40]、100 µg/ml salmon sperm DNA)で 42 °C、一晩、膜をハイブリダイズした。コントロールのハイブリダイズとしてβ-Actin の cDNA (287 bp; 862-1148 [41])を用いた。膜を 0.1 x SSC、0.1 % SDS 室温および 50 °C で余分なプローブを洗い流した。膜を X 線フィルムで検出し、バンドの濃淡はデンストメーターにて定量化した。

## 8 RT-PCR 解析

各ラットより調製した腸トータル RNA 5 µg からキット(Ready-To-Go T-primed First-Strand Kit, Amersham-Pharmacia Biotech, Sweden)を用いて cDNA を作製した。以下に示す PCR プライマーを用い、*Taq* DNA ポリメラーゼ(Stratagene, USA)を用いて反応させた。(Cdx1; sense primer 5'-AAGACTCGGACCAAGGACAAGTA-3'、antisense primer 5'- AACTGTGTGGGAGGCATGGGCTGC -3' (1-252) [42]、Cdx2; sense primer 5'- CGCGAGGACTGGAATGGCTA -3'、antisense primer 5'-CCGGATG

GTGAGGGTGATGA -3' (139-295) [43],  $\beta$ -actin; sense primer 5'- ATCCGTAAAGAC  
CTCTATGC -3', antisense primer 5'- AACGCAGCTCAGTAACAGTC -3' (862-1148)

[41]) 反応条件は初期変性 94 °C 3 分の後、94 °C 30 秒、62 °C 30 秒、72 °C 30 秒  
を 37 サイクル後、72 °C 7 分で伸長させた。PCR 産物を 1.5 %アガロースで電気  
泳動後 DNA をエチジウムブロマイドで染色、バンドの濃淡はデンスitometer  
にて定量化した。

## 9 統計処理

統計的評価は Student's *t* テストを用いた。データは mean  $\pm$  SEM を用い、 $P < 0.05$   
をもって統計的有意差とした。

### 第 3-3 節 結果

#### 1 体重、血糖、血中インスリンおよび HbA<sub>1c</sub> (Table 3-1)

STZ ラットの体重は対照ラットに比して有意に減少した。また GK ラットの体重は対照ラットに比して各週齢で有意に低値を示した。一方 OLETF ラットの体重は対照ラットに比し各週齢で有意に高値を示し肥満を呈した。

血糖値は各糖尿病ラットでそれぞれ各週齢とも対照に比して有意に高値を示した。

血中インスリン値は STZ ラットでは対照ラットに比し著しく低値を示した。また GK ラットでもインスリン値は対照ラットに比して各週齢とも有意に低値を示し、インスリン欠乏が認められた。一方 OLETF ラットのインスリン値は対照ラットに比して有意に高値を示し、高インスリン血症を呈した。

HbA<sub>1c</sub> は高血糖を反映して STZ ラット、10 および 20 週齢の GK ラット、30 週齢の OLETF ラットにおいてそれぞれ同週齢の対照ラットに比し有意に高値を示した。

#### 2 小腸の組織像と粘膜タンパク含有量 (Fig. 3-1, Table 3-2)

小腸の垂直切片の HE 染色像により小腸絨毛長を測定したところ、それぞれの糖尿病ラット各週齢で対照ラットに比し有意な伸長化を認めた。また小腸 1 cm あたりの粘膜タンパク含有量もそれぞれの糖尿病ラット各週齢で対照ラットに

比して有意に高値を示した。

### 3 スクラーゼ、イソマルターゼのタンパクあたりの比活性および小腸 1 cm あたりの総活性 (Fig. 3-2)

スクラーゼおよびイソマルターゼの 1 mg タンパクあたりの比活性は STZ ラットでは対照ラットに比し有意に高値を示した。しかし、GK ラットおよび OLETF ラットにおいては対照ラットとは比活性に差を認めなかった。しかしながら、小腸 1 cm あたりの総活性は粘膜タンパク量を反映して、それぞれの糖尿病ラット各週齢で対照ラットに比し有意に高値を示した。

### 4 SI のタンパクおよび mRNA 発現 (Fig. 3-3)

SI のタンパクおよび mRNA 発現については比活性と同様、STZ ラットでは対照ラットに比して高発現を示したが、GK ラットおよび OLETF ラットにおいては対照ラットに比して SI 発現に差を認めなかった。

### 5 SI 抗体での免疫染色 (Fig. 3-4)

SI 抗体を用いた小腸切片の免疫染色を行い、それぞれのラットの各週齢における SI タンパク発現の分布および絨毛部における SI タンパク発現シグナル強度をデンストメーターにて定量化した。STZ ラットでは対照ラットに比して分布範囲は  $1.6 \pm 0.2$  倍 ( $P < 0.01$ ) 広く、また発現シグナル強度  $2.0 \pm 0.2$  倍 ( $P < 0.01$ ) のレ

ベルであった。OLETF ラットおよび GK ラットでは各週齢とも発現シグナル強度は対照ラットと同程度(各ラット、各週齢とも  $1.0 \pm 0.1$  倍、ND)であったが、分布はOLETF ラットでは対照ラットに比し 10 週齢では  $1.4 \pm 0.2$  倍 ( $P < 0.05$ )、30 週齢では  $1.5 \pm 0.2$  倍 ( $P < 0.05$ )、GK ラットでは対照ラットに比して 10 週齢では  $1.4 \pm 0.2$  倍 ( $P < 0.05$ )、20 週齢では  $1.5 \pm 0.2$  倍 ( $P < 0.05$ )と広範囲であった。

## 6 Cdx1 および Cdx2 の発現 (Fig. 3-5)

RT-PCR 法によって、転写因子 Cdx1 および Cdx2 の発現量を検討した。STZ ラットでは対照ラットに比し Cdx1 および Cdx2 は有意に高発現であった。また OLETF ラットおよび GK ラットにおいても対照ラットに比して Cdx1 および Cdx2 は有意に高発現であった。

**Table 3-1** Body weight (BW), plasma glucose (PG), insulin and HbA<sub>1c</sub> levels

Strain	Age	BW (g)	PG (mM)	Insulin (pM)	HbA <sub>1c</sub> (%)
STZ		204 ± 8*	27.8 ± 0.3*	0.8 ± 0.4*	9.8 ± 1.4*
Wistar		266 ± 7	5.0 ± 0.1	206 ± 88	5.6 ± 0.1
GK	10 week	246 ± 4*	11.0 ± 1.2*	89 ± 11#	9.2 ± 0.3*
Wistar	10 week	270 ± 4	6.1 ± 0.5	192 ± 18	4.9 ± 0.2
GK	20 week	336 ± 8*	14.4 ± 0.5*	49 ± 9*	9.5 ± 0.4*
Wistar	20 week	440 ± 9	5.4 ± 0.6	364 ± 70	5.9 ± 0.3
OLETF	10 week	361 ± 4*	12.2 ± 0.7*	1274 ± 183*	6.9 ± 0.6
LETO	10 week	297 ± 6	5.0 ± 0.2	401 ± 154	6.3 ± 0.2
OLETF	30 week	445 ± 5*	17.9 ± 4.2*	2209 ± 184*	13.2 ± 0.3*
LETO	30 week	414 ± 7	6.7 ± 0.8	371 ± 133	6.6 ± 1.0

Data are expressed as means ± SEM. Each group of n=5. \**P*<0.01, #*P*<0.05 vs age matched control rats.

**Table 3-2** Villi length and mucosal protein content

Strain	Age	Villi length ( $\mu\text{m}$ )	Mucosal protein (mg / cm intestine)
STZ		$329 \pm 9^*$	$4.7 \pm 0.1^*$
Wistar		$280 \pm 7$	$2.3 \pm 0.1$
GK	10 week	$321 \pm 7^\#$	$3.0 \pm 0.1^\#$
Wistar	10 week	$302 \pm 8$	$2.4 \pm 0.1$
GK	20 week	$353 \pm 7^*$	$4.3 \pm 0.1^*$
Wistar	20 week	$324 \pm 5$	$3.6 \pm 0.1$
OLETF	10 week	$361 \pm 7^*$	$3.2 \pm 0.1^*$
LETO	10 week	$339 \pm 5$	$2.6 \pm 0.1$
OLETF	30 week	$414 \pm 9^*$	$4.8 \pm 0.1^*$
LETO	30 week	$382 \pm 7$	$4.1 \pm 0.1$

Data are expressed as means  $\pm$  SEM. Each group of n=5. \* $P$ <0.01, # $P$ <0.05 vs age matched control rats.

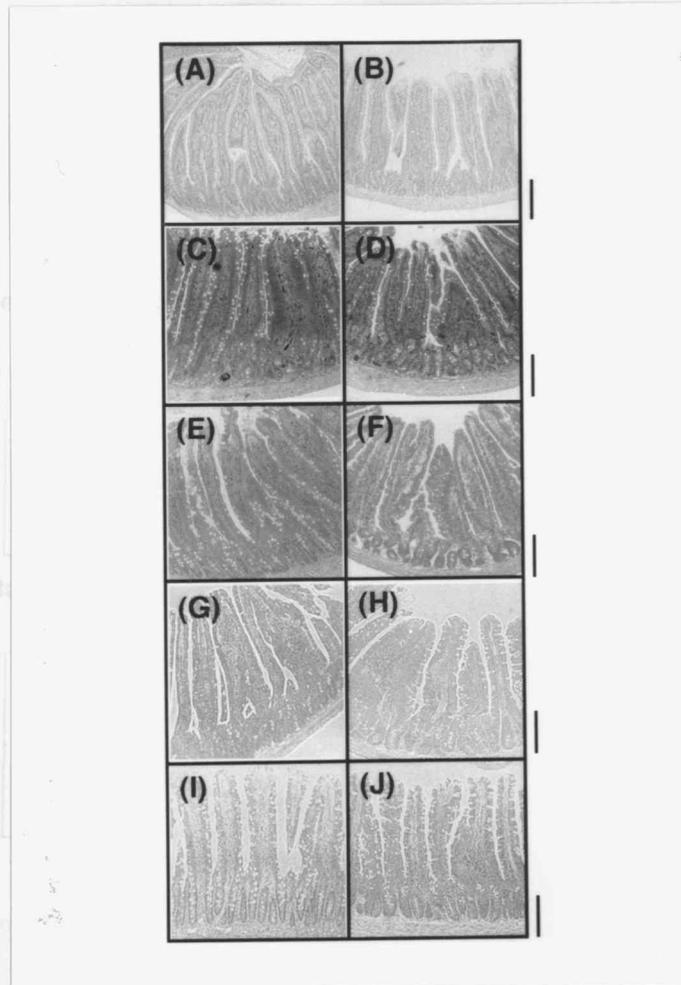
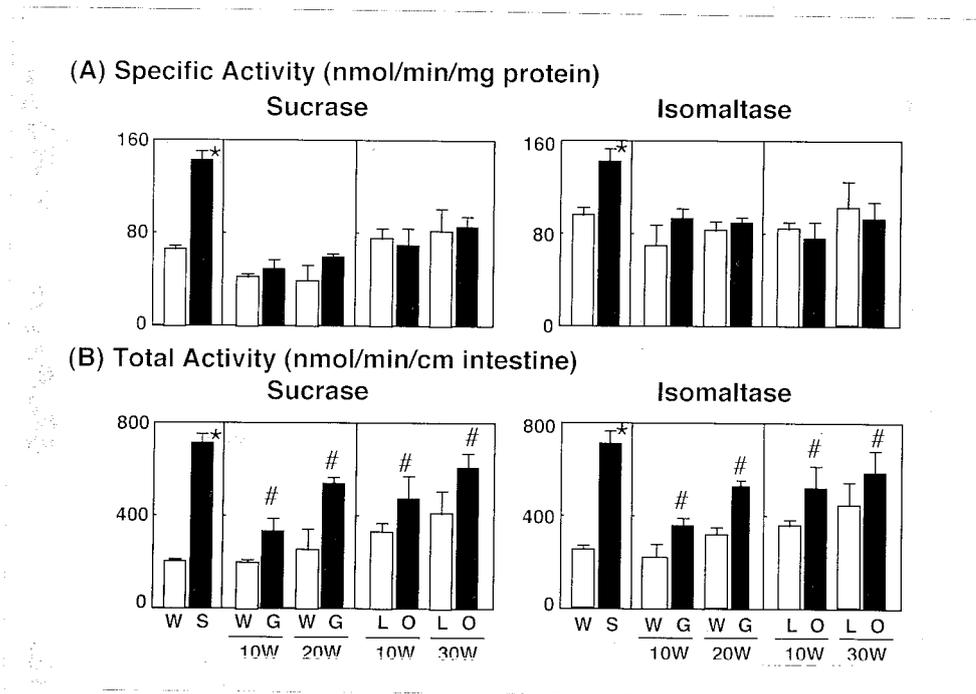
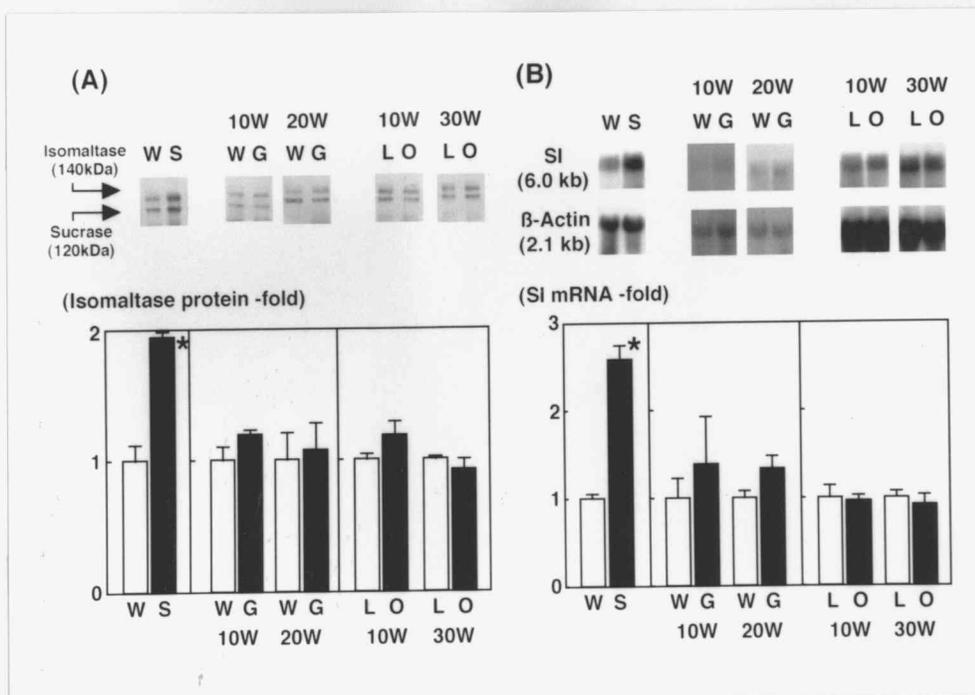


Fig. 3-1 Morphology of small intestine. STZ rat and control Wistar rat are shown in (A) and (B), respectively. OLETF rat and control LETO rat are in (C) and (D) at 10-week-old, and (E) and (F) at 30-week-old, respectively. GK rat and control Wistar rat are in (G) and (H) at 10-week-old, and (I) and (J) at 20-week-old, respectively. Original magnification x 40. Bar: 200  $\mu$ m.



**Fig. 3-2** Specific activities (A) and total activities (B) of sucrase and isomaltase in the small intestine. The specific and total activities of sucrase and isomaltase in STZ, OLETF, GK (solid bars) and each control group of rats (open bars) rats at different ages are determined as described in section 3-2. Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n=5). W; Wistar rats, S; STZ rats, G; GK rats, L; LETO rats, O; OLETF rats. \* $P < 0.01$ , # $P < 0.05$ , compared with with age-matched control rats in each strain.



**Fig. 3-3** Expression of SI complex protein (A) and mRNA (B). (A) Expression levels of the sucrase and isomaltase subunits. Immunoblots of the sucrase and isomaltase subunits are quantified by scanning densitometry. Relative intensity of isomaltase subunit expression was calculated and the expression in age-matched each control rats was normalized as 1. (B) Expression level of mRNA for the SI complex. Northern blots are quantified by scanning densitometry. Relative intensity of SI mRNA expression was calculated against each beta-actin mRNA expression, and the expression in age-matched each control rats was normalized as 1. Data (n=5,  $\pm$  SEM) are presented as relative values (-fold of the level of respective age-matched control rats). W; Wistar rats, S; STZ rats, G; GK rats, L; LETO rats, O; OLETF rats. \* $P < 0.01$ , # $P < 0.05$  compared with with age-matched control rats in each strain.

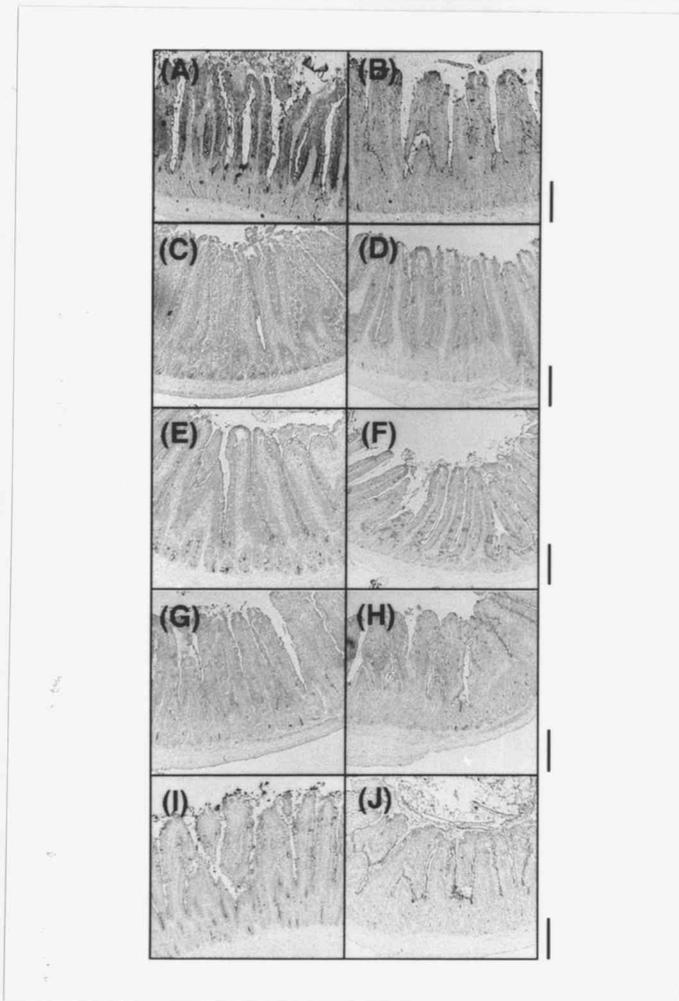
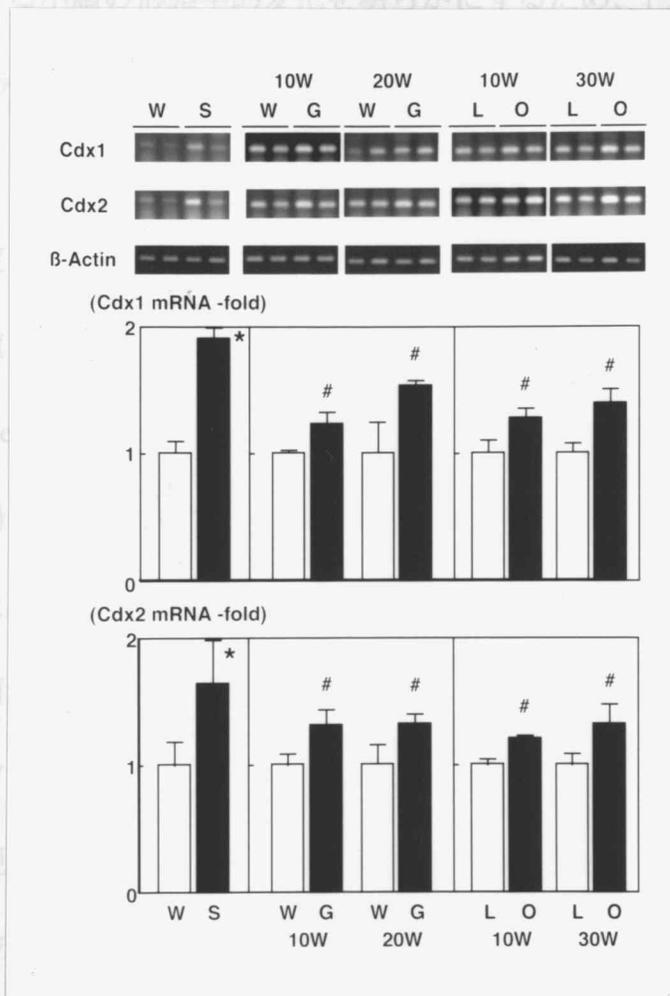


Fig. 3-5 Quantitative RT-PCR analysis of Cdx 1 and 2 in small intestinal mRNA.

**Fig. 3-4** Immunohistochemistry with SI in the small intestine. STZ rat and control Wistar rat are shown in (A) and (B), respectively. OLETF rat and control LETO rat are in (C) and (D) at 10-week-old, and (E) and (F) at 30-week-old, respectively. GK rat and control Wistar rat are in (G) and (H) at 10-week-old, and (I) and (J) at 20-week-old, respectively. Original magnification x 40. Bar: 200  $\mu$ m. *age-matched control rats in each strain.*



**Fig. 3-5** Quantitative RT-PCR analysis of Cdx 1 and 2 in small intestinal mRNA. Relative intensity of Cdx 1 and 2 mRNA expression was calculated against each beta-actin mRNA expression, and the expression in age-matched each control rats was normalized as 1. Data (n=5,  $\pm$  SEM) are presented as relative values (fold of the level of age-matched each control rats). W; Wistar rats, S; STZ rats, G; GK rats, L; LETO rats, O; OLETF rats. \* $P < 0.01$ , # $P < 0.05$  compared with with age-matched control rats in each strain.

### 第3-4節 考察

糖尿病における小腸の形態学的変化を明らかにするため、インスリン欠乏モデルである STZ ラット、2 型糖尿病モデルである OLETF ラットおよび GK ラットを用いて、各ラット小腸粘膜タンパク量を測定し、また小腸切片を HE 染色し小腸絨毛長を測定した。その結果小腸粘膜のタンパク含有量が各糖尿病ラットで対照に比して高値を示し、また小腸絨毛は各糖尿病ラットで対照に比して伸長化した(Fig. 3-1, Table 3-2)。この結果からインスリン欠乏の糖尿病、2 型糖尿病どちらにおいても小腸の過形成が認められ、糖尿病において小腸内表面積が増加することが示唆された。

次に各糖尿病ラットにおける SI 活性および発現について検討した。STZ ラットでは 1 mg タンパクあたりの SI の比活性が亢進し、また SI タンパクおよび mRNA も高発現を認めた(Fig. 3-2, 3-3)。しかしながら OLETF ラットおよび GK ラットでは SI の比活性は対照ラットに比して差を認めず、また SI タンパクおよび mRNA の発現も対照ラットと同レベルであった(Fig. 3-2, 3-3)。本章で 10 および 30 週齢で行った OLETF ラットの SI 比活性と発現の実験結果は、第 2 章の 40 週齢までの結果と一致していた。GK ラットにおいても OLETF ラットと同様 SI 比活性の亢進は認められなかった。しかしながら、各糖尿病ラットにおいて小腸内表面積の増加が認められた(Fig. 3-1, Table 3-2)ことから、小腸全体での SI 発現

を検討することが必要である。そこで次に小腸絨毛における SI の免疫染色を行った。その結果、STZ ラットでは SI 発現シグナル強度が対照に比して約 2 倍程度となり、また発現分布も広範囲となった。一方 OLETF ラットおよび GK ラットで各週齢とも発現シグナル強度は対照ラットと同程度であったが、発現分布は広範囲であった(Fig. 3-4)。さらに各糖尿病ラットにおけるスクラーゼ、イソマルターゼの小腸 1 cm あたりの総活性も対照に比して有意に高値を示した(Fig. 3-2)。この結果から糖尿病ラットにおいて SI の発現表面積が拡大することによって、小腸全体における SI の総活性が亢進することが明らかとなった。

小腸の増殖、分化および SI 発現に転写因子 Cdx1 および Cdx2 が関与することが報告されている[32, 33, 34]。RT-PCR 法において Cdx1 および Cdx2 の mRNA の発現量を検討した結果、各糖尿病ラットで有意に発現の増加が認められた(Fig. 3-5)。小腸には Cdx1 および Cdx2 以外にも転写因子は存在するが、糖尿病における Cdx1 および Cdx2 の発現亢進が、小腸の過形成および SI 発現の誘導を引き起こす可能性が考えられる。

以上より、インスリン欠乏糖尿病および 2 型糖尿病において小腸が過形成を示し、その結果 SI の発現表面積が非糖尿病対照に比して増加することによって、SI の総活性が高くなることが示された。本章の結果から、糖尿病における食後の過血糖は生体内糖代謝異常に加え、小腸からの炭水化物を始めとした消化の亢進もひとつの要因である可能性が示唆された。

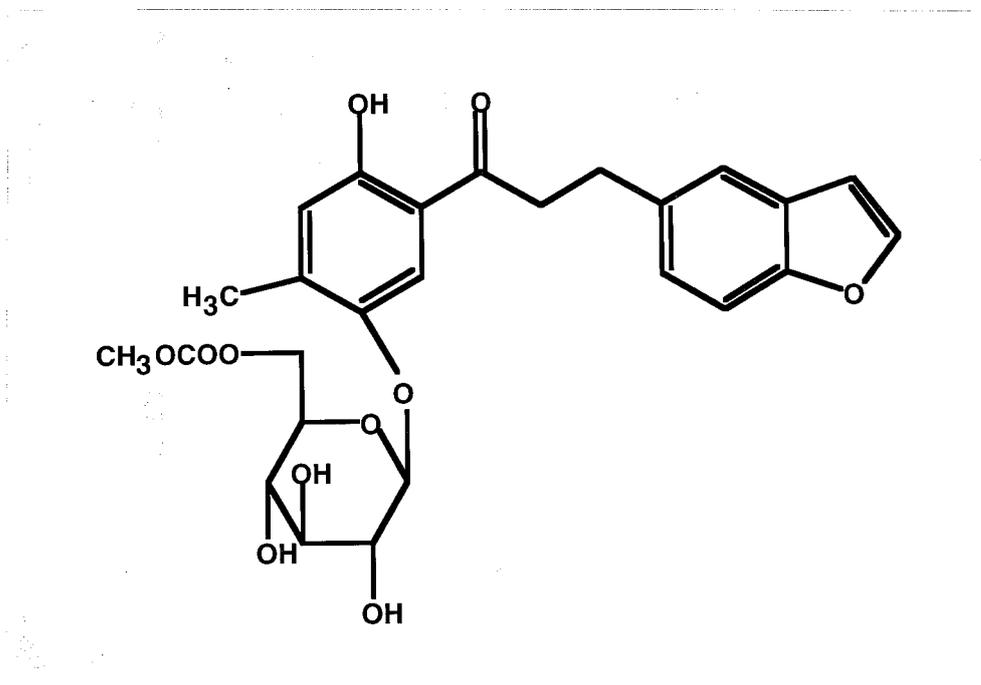
## 第4章 Na<sup>+</sup>-グルコース共輸送担体阻害剤 T-1095 によるストレプトゾトシン誘導糖尿病ラットの高血糖抑制効果

### 第4-1節 序論

Na<sup>+</sup>-グルコース共輸送担体 2 (SGLT2)は腎で重要な糖輸送担体であり、主に尿細管 S1 部に存在し、糸球体で濾過された大半のグルコースを再吸収する[44]。また SGLT1 は主に尿細管 S3 部に存在し、S1 部で再吸収されなかったグルコースを吸収する役割を担う[45]。フロリジンは SGLT の阻害剤であり、糖尿病モデル動物においてグルコースの再吸収を抑制し、結果的に尿糖を増加させ、血糖降下が可能であることが報告されている[46]。しかし、経口投与のフロリジンは小腸からほとんど吸収されず、またほとんどがフロレチンに分解され、促通拡散型糖輸送担体(GLUT)を阻害することが報告されている[47, 48, 49, 50]。このことからフロリジンは腎の糖再吸収阻害として経口投与法は有効ではないと考えられる。新しく開発された T-1095 (Fig.4-1) (田辺製薬)はフロリジンの誘導体でありプロドラッグであるため、経口投与可能で小腸から吸収後生体内で活性体に変化する薬剤である[51, 52]。この生体内で活性化された T-1095 は腎の SGLT の特異的阻害剤であり、尿細管のグルコースの再吸収を阻害し、過剰な糖の尿中への排出が可能となる。

糖尿病性腎症は糖尿病性合併症のひとつである。糖尿病性腎症になると、形態学的には腎肥大、糸球体肥大、メサンギウム領域の拡大および糸球体基底膜の肥厚が認められる。また機能的には糸球体過剰濾過が認められ、アルブミン尿が生じる。腎症で認められる異常を引き起こすひとつの原因が高血糖であり、正常な腎機能を保持するために血糖コントロールが必須である。

そこで本章では、糖尿病モデルとしてストレプトゾトシン誘導糖尿病(STZ)ラットを用い、糖の再吸収を抑制するという新しい考え方による薬剤 T-1095 を経口投与させることによって薬剤の血糖および腎の機能的および形態学的変化におよぼす効果について検討した。さらに、この T-1095 は SGLT 阻害薬であることから、SGLT の存在する腎や小腸への影響を明らかにするため、腎および小腸の SGLT の発現レベルを検討した。また、促進拡散型糖輸送担体のうち GLUT2 は糖尿病ラットにおいて腎および小腸で非糖尿病ラットに比して有意に高発現すること[23, 53, 54]から、腎および小腸での GLUT2 の発現に対する検討も加えた。



**Fig. 4-1** Structure of T-1095.

(T-1095 is synthesized in Discovery Research Laboratory of Tanabe Seiyaku, Japan.)

## 第 4-2 節 材料および方法

### 1 糖尿病モデル動物作製と動物飼育

6 週齢の Wistar 雄ラット(Japan SLC, Japan)に体重 1 kg あたり 50 mg の STZ を含む 50 mM クエン酸ナトリウム(pH 4.5) 溶解液 100  $\mu$ l を尾静脈より注射し、STZ 誘発糖尿病ラットを作製した。STZ 投与後 1 週間通常食 CE-2 (Crea Japan, Japan) で飼育後、CE-2 を続けて与えた群 (STZ ラット群、n=8)、0.1 % w/w T-1095 添加 CE-2 に切り換えた群(T-1095 ラット群、n=8)にわけた。非糖尿病ラット群(対照ラット群、n=10)には 50 mM クエン酸ナトリウム (pH 4.5) 100  $\mu$ l を尾静脈注射したものに CE-2 を与えた。SPF 施設で 12 時間の昼夜サイクル(昼は 7:00~19:00、夜は 19:00~7:00)、温度 23  $^{\circ}$ C、湿度 55 %で飼育した。飼料および水は自由摂取させた。

### 2 血糖値、ヘモグロビン A<sub>1c</sub> レベル、尿糖および尿アルブミン排泄量の測定

各飼料投与前および 4、8 週間後血糖値を酵素法(Blood Glucose Test, Boehringer-Mannheim, Germany)で測定した。さらに 4 および 8 週間後にはヘモグロビン A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>)レベルをアフィニティークロマトグラフィー法(Glyc-Affin. Ghb, Sekagaku Kogyo, Japan)で測定した。また 8 週間後にラットを代謝ケージで 24 時間飼育し、尿を採取、尿糖排泄量(Glucose Analyzer, APEC, USA)、尿アルブミン排泄量(Panatest rat albumin, Panafarmlaboratories, Japan)を測定した。

### 3 腎および小腸サンプルの調製と組織切片の作製

各飼料で8週間飼育したラットをジエチルエーテルで麻酔後、腎臓を摘出し腎重量を測定した。左腎は液体窒素で凍結後以下に示す実験の使用まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。右腎は Carnoy 液で固定後パラフィンで包埋、厚さ  $3\ \mu\text{m}$  の切片を作製し hematoxylin-eosin (HE)あるいは periodic acid Schiff (PAS)染色した。HE 染色標本を用いて、空胞化する尿細管の出現頻度をスコア化した。PAS 染色標本からそれぞれの切片上において 30 個の糸球体を任意に選択した。Mac SCOPE (Mitani Corporation, Japan) を用いて糸球体面積を測定し、各々の糸球体面積の平均値を算出した。

空腸は摘出し 2 分した。上部は氷冷したリン酸緩衝液(PBS)で軽くすすぎ液体窒素で凍結後以下に示す実験の使用まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。下部は 10 %ホルマリンで固定しパラフィンで包埋、厚さ  $3\ \mu\text{m}$  の切片を作製し HE 染色した。各切片について絨毛長を 10 箇所測定した。

### 4 イムノブロット

各ラットの腎および腸を mannitol / Hepes-Tris 緩衝液(100 mM mannitol, 10 mM Hepes-Tris (pH 7.0))でホモジナイズした。そのホモジネートを  $3000\ \text{x}\ \text{g}$ 、10 分間遠心した。粗膜分画を得るため、上清を  $100000\ \text{x}\ \text{g}$ 、1 時間遠心した。粗膜分画のタンパク量は Lowry 法[36]で測定した。粗膜分画タンパク  $10\ \mu\text{g}$  を SDS-PAGE

[19]後、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Millipore, USA)に転写した。その PVDF 膜を抗 SGLT1 あるいは GLUT2 抗体(Santa Cruz Biotechnology, USA)で処理し、アルカリホスファターゼの結合した二次抗体(Cosmo Bio, Japan)で処理した。4-nitro tetrazolium chloride / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate 4-toluidine salt を用いて検出した。バンドの濃淡はデンストメーターにて定量化した。

## 5 ノーザンブロット

各ラットの腎および腸からトータル RNA を guanidinium thiocyanate cesium chloride 法 [38, 39]により抽出した。各 20  $\mu$ g のトータル RNA を glyoxal-dimethyl sulfoxide で変性し、1%アガロースゲルで電気泳動後、20 x SSC (3 M NaCl, 300 mM *tri*-sodium citrate)下でナイロン膜(Hybond N, Amersham-Pharmacia Biotech, Sweden)に転写した。<sup>32</sup>P でラベルした SGLT1 (625 bp; 1810-2434 [44])、SGLT2 (570 bp; 1612-2181 [55])および GLUT2 (1485 bp; 1-1485 [56]) cDNA を合成し(Nick Translation Kit, Amersham-Pharmacia Biotech, Sweden)、これらをプローブに用いた。10<sup>6</sup> count /分の量のプローブを含むハイブリダイゼーション緩衝液(50 % formamide、5 x SSC、10 % dextran sulfate sodium salt、0.25 % SDS、20 mM sodium phosphate (pH 7.0)、2 x Denhardt's reagent [40]、100  $\mu$ g/ml salmon sperm DNA)で 42 °C、一晩、膜をハイブリダイズした。コントロールのハイブリダイズとして $\beta$ -Actin の cDNA (287 bp; 862-1148 [41])を用いた。膜を 0.1 x SSC、0.1 % SDS 室温でその

後 50 °C で余分なプローブを洗い流した。膜を X 線フィルムで検出し、バンドの濃淡はデンシトメーターにて定量化した。

## 6 統計処理

統計的評価は Student's *t* テストを用いた。データは mean ± SEM を用い、 $P < 0.05$  をもって統計的有意差とした。

## 第 4-3 節 結果

### 1 体重、血糖および HbA<sub>1c</sub> レベル (Table 4-1)

血糖値は T-1095 投与前ではラット間で差を認めなかった。しかし投与後 4 および 8 週における T-1095 ラット群の血糖値は STZ ラット群に比して有意に低値を示した。T-1095 ラット群の体重は STZ ラット群に比して有意に高値を示した。また HbA<sub>1c</sub> レベルは T-1095 ラット群では STZ ラット群に比して有意に低値を示した。

### 2 腎重量、尿アルブミンおよび尿糖排泄量、腎の組織学的変化 (Table 4-2, Fig. 4-2)

投与後 8 週で T-1095 ラット群の腎重量は、STZ ラット群に比して有意に低値を示した。また体重当りの腎の重量%も T-1095 ラット群で STZ ラット群に比し有意に低値を示した。尿中アルブミン排泄量は対照ラット群に比して STZ ラット群で有意に高値を示したが、T-1095 ラット群では STZ ラット群に比して有意に低いレベルであった。尿糖排泄量は T-1095 ラット群で STZ ラット群に比して有意に高値を示した。

腎組織を HE 染色したところ、尿細管の空胞化の頻度が T-1095 ラットにおいて STZ ラットに比して低かった。しかしながら腎組織を PAS 染色し糸球体面積を測定したところ対照、STZ および T-1095 ラットで変化は認められなかった(data

not shown)。

### 3 腎における糖輸送担体の発現 (Fig. 4-3)

8週間 T-1095 投与によって、SGLT2 の mRNA 発現は対照、STZ および T-1095 ラットの 3 群間に差は認められなかった。SGLT1 の mRNA は STZ ラットでは対照ラットに比して、さらに T-1095 ラットでは STZ ラットに比して有意に高発現した。一方 GLUT2 の mRNA は T-1095 ラットでは STZ ラットに比して有意に発現が低下した。

SGLT1 のタンパク発現は、T-1095 ラットでは対照および STZ ラットに比して有意に高発現した。GLUT2 のタンパク発現は、STZ ラットでは対照ラットに比し高く、T-1095 ラットでは STZ ラットに比べ低下した。

### 4 T-1095 の小腸糖輸送担体の発現と組織化学的变化への影響 (Fig. 4-4, 4-5)

SGLT1、GLUT2 の mRNA およびタンパク発現量は、STZ ラットでは対照ラットに比して有意に高発現した。8週間の T-1095 投与によって、SGLT1、GLUT2 の mRNA およびタンパク発現は STZ ラットに比して有意ではないが低い傾向となり、対照ラットと有意な差を認めなかった。

小腸組織の HE 染色像において、小腸絨毛が STZ および T-1095 ラットで対照ラットに比し有意に伸長化したが、STZ ラット、T-1095 ラット間に組織学的な違いは認められなかった (小腸絨毛長: 対照 vs STZ vs T-1095;  $283 \pm 7$  vs  $319 \pm 8$  vs

$315 \pm 7 \mu\text{m}$ ).

**Table 4-1.** Body weight, plasma glucose, and HbA<sub>1c</sub> levels in normal Wistar control, STZ and T-1095 rats

	Week	Normal	STZ	T-1095
Body weight (g)	-1	190.5 ± 2.1	192.4 ± 3.1	189.5 ± 5.2
	0	240.5 ± 3.8	200.3 ± 2.6 §	197.8 ± 2.3 §
	4	285.6 ± 5.9	175.0 ± 4.2 §	201.5 ± 3.8 §†
	8	321.2 ± 7.1	155.5 ± 5.4 §	189.2 ± 11.2 §†
Plasma glucose (mM)	0	4.8 ± 0.1	18.4 ± 0.4 §	18.9 ± 0.4 §
	4	5.7 ± 0.1	28.9 ± 1.0 §	14.1 ± 0.2 §#
	8	5.0 ± 0.1	26.4 ± 1.2 §	15.8 ± 1.3 §§
HbA <sub>1c</sub> (%)	4	5.3 ± 0.1	14.0 ± 0.5 §	8.8 ± 0.4 §#
	8	5.1 ± 0.1	17.0 ± 0.8 §	9.2 ± 0.8 §#

-1 week shows the week of administration of STZ, and 0 week shows a week after the administration of STZ and before the beginning of administration of T-1095. Data are expressed as means ± SEM. Normal Wistar rats n=10, STZ and T-1095 rats n=8 respectively at -1 and 0 week, and normal Wistar rats n=5, STZ and T-1095 rats n=4 at 4 and 8 week. §*P*<0.001 vs normal Wistar rats, †*P*<0.05, #*P*<0.001, \$*P*<0.01 vs STZ rats, respectively.

**Table 4-2.** Kidney weight, kidney weight as a percentage of body weight (KW/BW), urinary glucose and albumin excretion in normal Wistar control, STZ, and T-1095 rats after 8 weeks.

	Normal	STZ	T-1095
Kidney weight (g)	2.04 ± 0.02	2.45 ± 0.18 *	2.18 ± 0.06
KW/BW (%)	0.63 ± 0.01	1.57 ± 0.09 §	1.27 ± 0.02 §†
Urinary glucose excretion (mg/24hr)	4 ± 1	7546 ± 270 §	8687 ± 336 §†
Urinary albumin excretion (µg/24hr)	450 ± 130	1649 ± 200 §	781 ± 156 §†

Data are expressed as means ± SEM. Normal Wistar rats n=5, STZ and T-1095 rats n=4.

\* $P < 0.05$ , § $P < 0.001$  vs normal Wistar rats, † $P < 0.05$  vs STZ rats.

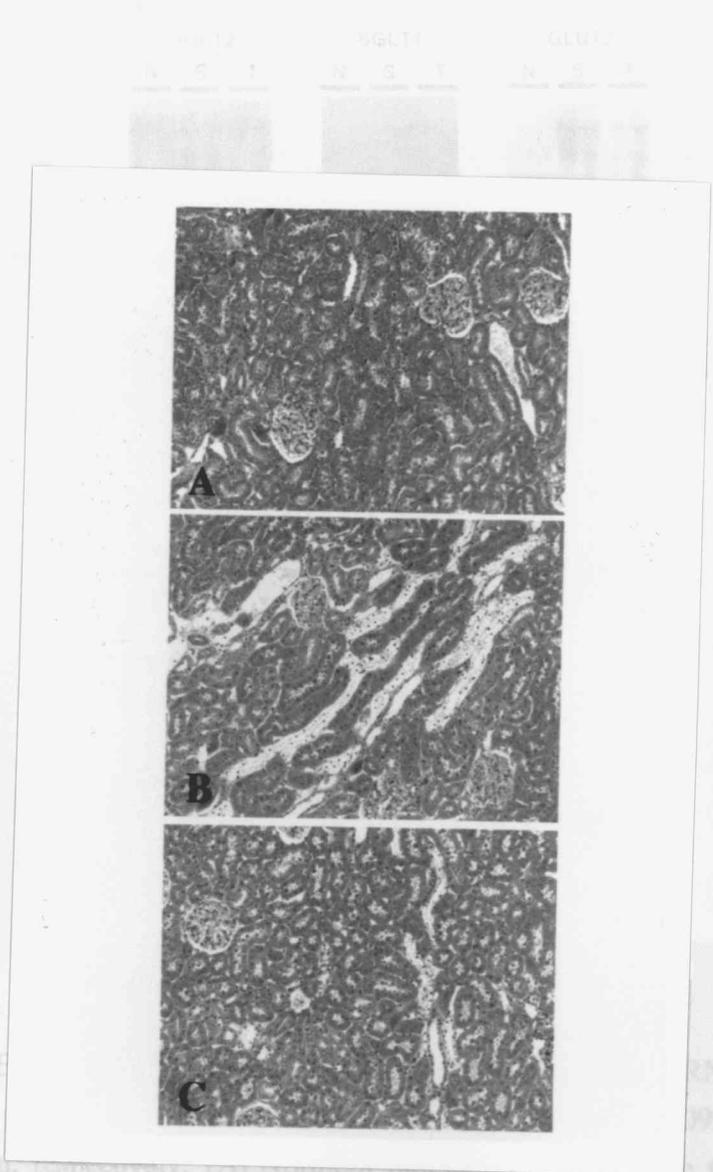
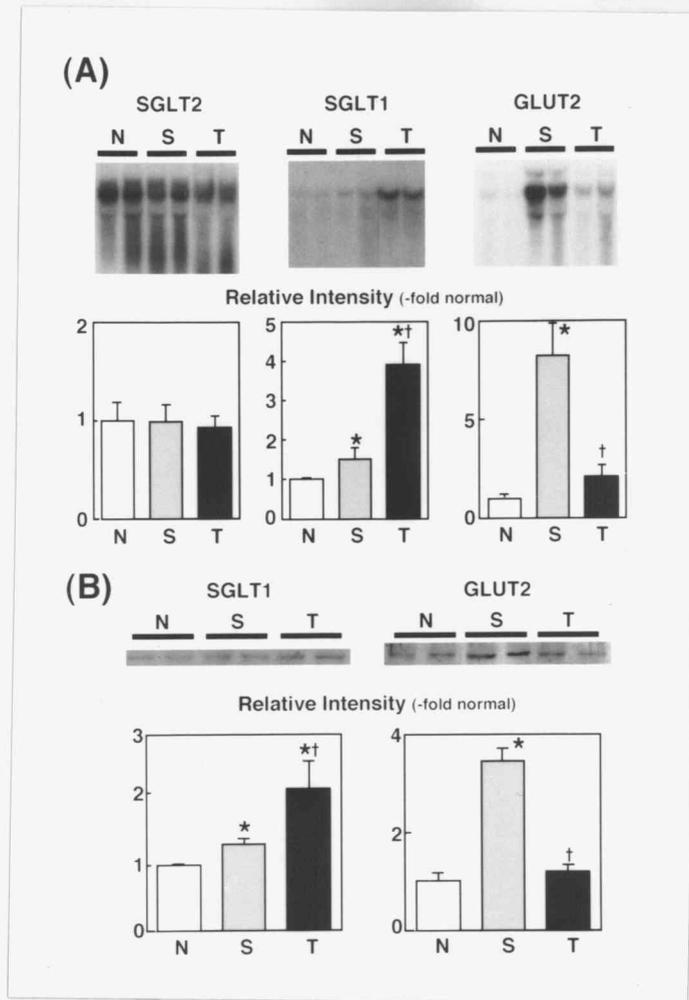
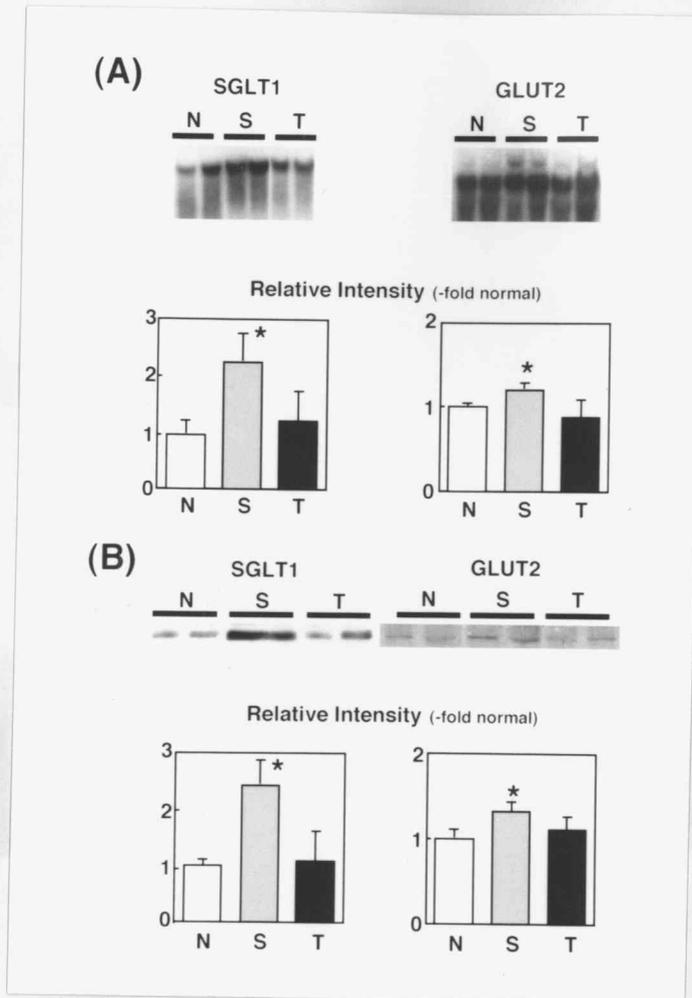


Fig. 4-2 Hematoxylin and eosin (HE)-stained histological sections from kidney. Photomicrographs of kidney from normal Wistar control (A), STZ (B), and T-1095 (C) rats 8 weeks after administration of each diet.

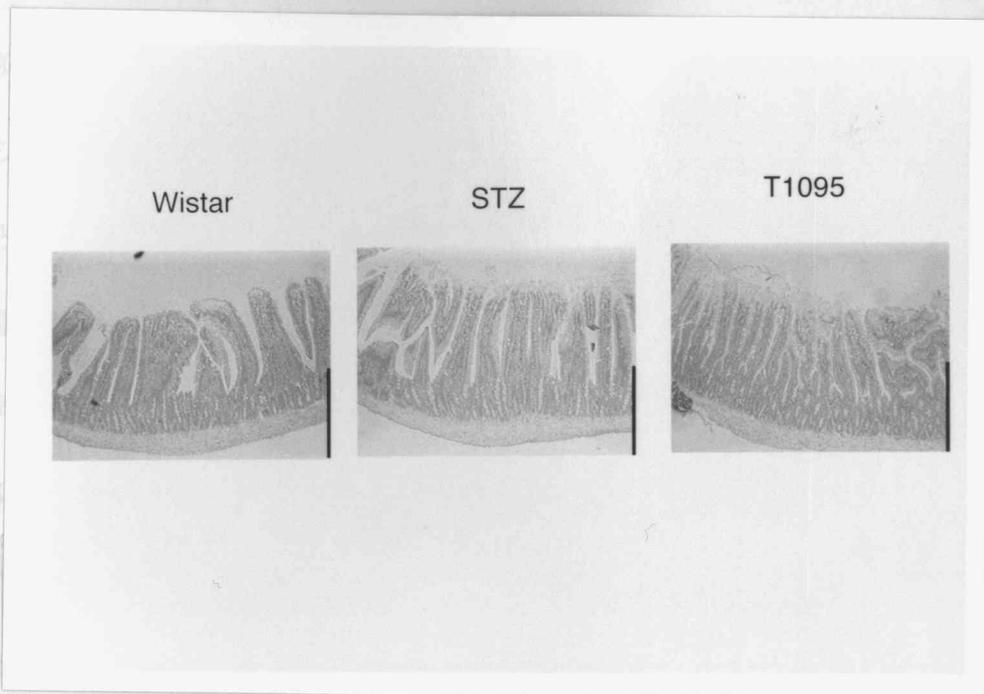


**Fig. 4-3** Expression of renal SGLT1, SGLT2, and GLUT2 mRNA (A), and SGLT1 and GLUT2 protein (B) in normal Wistar control, STZ, and T-1095 rats 8 weeks after administration, respectively. (A) Northern blot analysis of glucose transporters. A beta-actin cDNA served as control hybridization. Relative intensity of each glucose transporter mRNA expression was calculated against each beta-actin mRNA expression, and the expression of normal Wistar rats was normalized as 1. (B) Immunoblot analysis of SGLT1 and GLUT2 in each group of rats. Relative intensity of each glucose transporter protein expression was calculated and the expression in normal Wistar rats was normalized as 1. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM. N; normal Wistar rats, S; STZ rats, T; T-1095 rats. Normal Wistar rats; n=5, STZ rats; n=4, T-1095 rats; n=4. \*,  $P < 0.05$ , vs normal Wistar rat group, †;  $P < 0.05$ , vs STZ rat group.



**Fig. 4-4** Expression of intestinal SGLT1 and GLUT2 mRNA (A) and protein (B) in normal Wistar control, STZ, and T-1095 rats 8 weeks after administration. (A) Northern blot analysis of SGLT1 and GLUT2. Relative intensity of each glucose transporter mRNA is calculated as the expression of normal Wistar rats to 1. A beta-actin cDNA served as control hybridization. (B) Immuno blot analysis of SGLT1 and GLUT2. Relative intensity of each glucose transporter protein was calculated and the expression of normal Wistar rats was normalized as 1. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM. N; normal Wistar rats, S; STZ rats, T; T-1095 rats. Normal Wistar rats; n=5, STZ rats; n=4, T-1095 rats; n=4. \*;  $P < 0.05$ , vs normal Wistar rat group. Section 4-2. Bar: 200  $\mu$ m.

新製に開発された T-1095 は生体内で新糖体に変化し、腎の SGLT を特異的に阻害するという新しい考え方の薬剤である[19]。本章ではインスリン欠乏糖尿病モデルである STZ ラットにも薬剤 T-1095 を経口投与した。尿糖は T-1095 投与群で有意に高値を示したことから、腎臓の薬剤によって腎における糖の再吸収を抑制していることが示唆される。



グリコーゲン蓄積は血糖レベルに依存することが知られている。尿糖は糸球体より濾過されたグルコースを細胞内に取り込み、過剰なグルコースがグリコーゲンとなって蓄積する。尿糖でみられる高血糖は組織中のグリコーゲン蓄積を反映している。このことから T-1095 を用いて血糖を改善することによって

**Fig. 4-5** Morphological change of small intestine. Hematoxylin and eosin (HE)-stained histological sections were prepared in Section 4-2. Bar: 200  $\mu\text{m}$ .

#### 第 4-4 節 考察

新規に開発された T-1095 は生体内で活性体に変化し、腎の SGLT を特異的に阻害するという新しい考え方の薬剤である[8, 9]。本章ではインスリン欠乏糖尿病モデルである STZ ラットに 8 週間 T-1095 を経口投与した。尿糖は T-1095 投与群で有意に高値を示したことから、SGLT の阻害によって腎における糖の再吸収を抑制することが示唆された。それに伴って血糖および HbA<sub>1c</sub> は低下した。フロリジンは皮下注射でも血糖の改善が認められている[46, 57]が、経口投与するとほとんど吸収されず、また小腸で分解されることによって促通拡散型糖輸送担体を阻害するので、経口剤としては適当ではない。T-1095 はフロリジンの皮下注射と同様の効果を示す経口投与可能な薬剤であることが示唆された。

STZ ラットでは腎が肥大し、尿細管の空胞化といった病理組織学的変化が認められるが、T-1095 投与により組織変化が改善された。STZ ラットおよび WBN / Kob ラットでグリコーゲン顆粒が尿細管に蓄積すること[58, 59, 60]、またこのグリコーゲン蓄積は血糖レベルに依存すること[61]が報告されている。尿細管では糸球体より濾過されたグルコースを細胞内に取り込み、過剰なグルコースがグリコーゲンとなって蓄積する。尿細管でみられる空胞化は組織中のグリコーゲン蓄積を反映している。このことから T-1095 を用いて血糖を改善することによって尿細管でのグリコーゲン蓄積が抑制されているものと考えられる。

本章の結果では、8 週間 STZ 糖尿病ラットにおいて糸球体に有意な組織学的変化は認められなかったが、アルブミン尿は生じた。一方 T-1095 投与によって尿アルブミン排泄が減少した。この結果から、T-1095 による高血糖の是正が過剰濾過を抑制し、糖尿病による糸球体機能変化を抑制する可能性が示唆された。

SGLT2 は近位尿細管の S1 部に存在しほとんどのグルコースを再吸収する重要な腎の糖輸送担体である[44]。SGLT1 は近位尿細管の S3 部に存在し S1 部で未吸収のグルコースを再吸収する糖輸送担体として知られる[45]。本章において SGLT2 は対照、STZ および T-1095 の各ラット間で同レベルの mRNA 発現であったが、SGLT1 の mRNA およびタンパク発現は T-1095 ラットでは対照および STZ ラットに比して有意に高発現であった。SGLT2 は S1 部においてほとんどのグルコースを再吸収する糖輸送担体であり、輸送  $K_m$  値も高く[44]、また常に高い濃度のグルコースにさらされているため、対照、STZ および T-1095 ラット間で SGLT2 発現に差が認められなかったと考えられる。STZ ラットでは糸球体濾過されるグルコースが高濃度であるため、S1 部の SGLT2 での再吸収レベルをはるかに超える。その高い濃度のグルコースが S3 部へ流れ込んだ結果として、STZ ラットにおいて S3 部でのグルコース再吸収を促進するために SGLT1 の発現が誘導されたものと考えられる。また T-1095 ラットでは尿糖排泄量が STZ ラットに比して高レベルであったことから、T-1095 ラットでは STZ ラットに比して S3 部のグルコース濃度がさらに高くなった結果、SGLT1 が STZ ラットに比して高発現した

ことが推察される。SGLT1 および SGLT2 の発現レベルに関する考察を裏付ける報告はないが、本章の結果から特に腎における SGLT1、SGLT2 の発現に血糖および尿糖レベルが関与する可能性は高いことが示唆された。

SGLT1 は小腸上皮にも存在することが知られており、STZ ラットで小腸の糖輸送担体の発現レベルが亢進することが報告されている[23, 62]。本章において、小腸における SGLT1 の mRNA およびタンパクは、STZ ラットでは対照ラットに比して有意に高発現したが、T-1095 投与では対照ラットと同程度の発現となった。このことから T-1095 の投与によって高血糖が改善した結果、小腸での SGLT1 の発現が正常化したと考えられる。

GLUT2 は腎尿細管および小腸の側底膜に発現することが知られている[7, 13]。GLUT2 の発現は初代培養肝細胞においてグルコース濃度に依存することが報告されている[63]。本章において、腎および小腸での GLUT2 の mRNA、タンパクは STZ ラットでは対照ラットに比し有意に高発現したが、T-1095 投与によって発現が対照ラットと同レベルにまで低下した。このことから T-1095 による高血糖の改善によって、腎および小腸の GLUT2 の発現が抑制されることが示唆された。

本章では、T-1095 をインスリン欠乏糖尿病ラットである STZ ラットに経口投与することによって、血糖、HbA1c、尿アルブミン、腎重量および尿細管の空胞化を改善することができた。このようなことから、T-1095 はインスリン欠乏糖尿

病にインスリン治療法を用いず血糖を降下させることのできる新しい薬剤であり、その血糖降下によって腎合併症の進行を抑制できる可能性が示唆された。

## 第5章 まとめ

過食は食後血糖の上昇を引き起こし、この血糖を正常化するために過剰のインスリンが必要となってくる。食物-血糖-インスリンの関係の破綻が糖尿病の急増につながっている。糖尿病の小腸における消化吸收機能を検討することは、この3者の関係を議論する上で大変重要である。3大栄養素のひとつである炭水化物は生体エネルギーに不可欠である。炭水化物が吸収されるには単糖にまで分解されることが必須であり[1]、小腸での膜消化がその役割を果たしている[2]。小腸において炭水化物の最終消化を演じるのは二糖類水解酵素( $\alpha$ -グルコシダーゼ)群である。スクラーゼ・イソマルターゼ複合体(SI)はこの二糖類水解酵素群のひとつである。本論文第2章、第3章では糖尿病における消化吸收異常を解明するために、糖尿病におけるSIに注目した。

第2章では、2型糖尿病モデルのOLETFラットでSI活性について検討を行った。40週齢より若い週齢のOLETFラットにおいて対照のLETOラットに比して高血糖を示すにも関わらず、SIの一定タンパク量あたりの活性に差を認めなかった。一方48週齢OLETFではSIの活性亢進が認められた。48週齢OLETFラットではインスリンの基礎分泌が正常レベルであるにも関わらず、糖負荷試験において上昇した血糖を低下できないことから、このラットはインスリンの欠乏状態である可能性が考えられる。本論文の結果から、SIの活性はインスリンの高度な欠

乏によって亢進される可能性が示唆された。

第3章では、3種類の糖尿病モデルラット、すなわちインスリン欠乏モデルのSTZ誘導糖尿病ラット、2型糖尿病モデルのうち高インスリン血症であるOETFラットおよびインスリン分泌能の低いGKラットに関して、小腸における形態とSIの発現の検討を行った。各糖尿病モデルラットにおいて小腸絨毛の伸長化が認められた。また免疫組織化学的解析によって、STZ誘導糖尿病ラットではSI発現面積は対照に比して広範囲となり、またSI発現強度が対照に比して有意に高レベルであった。OETFおよびGKラットでも発現面積が対照に比して広範囲となった。この結果から糖尿病では小腸が過形成を示し、それに伴いSIの発現表面積の上昇し、糖消化吸収の亢進が引き起こされる可能性が示唆された。

糖尿病性腎症は糖尿病性合併症のひとつであり、腎症では腎肥大、糸球体過剰濾過がみられ、また尿アルブミンが増加する。この糖尿病性腎症で認められる異常を起こす原因のひとつが高血糖であり、正常な腎機能を保持するためには血糖コントロールが必須である。本論文第4章ではインスリン欠乏糖尿病モデルのSTZ誘導糖尿病ラットに、糖の再吸収阻害剤であるT-1095を投与して余剰の糖を尿中に排出させ血糖への効果を検討した。T-1095投与4週間でSTZラットの血糖が改善した。またSTZ誘導糖尿病ラットでは腎肥大、尿細管の空胞化のような病理組織学的変化が認められたが、8週間T-1095投与によって組織変化が改

善された。さらに T-1095 投与によって尿アルブミン排泄量が、非投与に比べ減少した。この結果から新しい薬剤 T-1095 によって STZ ラットの高血糖はインスリンを使用しなくても明らかに改善され、それに伴って腎の機能異常および組織変化が抑制される可能性が示唆された。

糖尿病モデルラットを用いた本研究において、小腸ではインスリン欠乏によって糖消化酵素の活性が亢進することを明らかにした。またインスリン欠乏糖尿病および2型糖尿病どちらにおいても、小腸絨毛が伸長化し糖の消化酵素の発現領域が拡大することを明らかにした。糖尿病における生体内での糖代謝が破綻することによって、糖の消化吸収の異常が引き起こされることが示唆された。また糖の消化吸収は生体における糖の流れの根幹をなしていることから、糖尿病によって引き起こされた消化吸収の異常がさらなる糖代謝異常を引き起こす可能性も示唆された。一方腎では新規血糖降下薬によって糖尿病で認められる腎障害が改善することを明らかにし、血糖コントロールが糖尿病性腎症の進行を抑制することが示唆された。本論文において糖尿病モデルラットで得られた糖の消化吸収および排泄に関する研究結果が、ヒトの糖尿病における病態の解明、新しい治療法の開発に貢献できるものと考えられる。

## 謝辞

本論文は、京都大学大学院人間・環境学研究科博士後期課程自然・人間共生基礎論講座(環境適応論講座)にて行った研究である。

本研究において、OLETF および LETO ラットを贈与して下さった大塚製薬株式会社徳島研究所に深く感謝いたします。また T-1095 を贈与して下さった田辺製薬株式会社創薬研究所に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なるご助言を賜りました京都大学大学院人間・環境学研究科自然・人間共生基礎論講座津田謹輔教授、同医学研究科病態代謝栄養学講座清野裕教授、大阪府立大学大学院農学研究科食品代謝栄養学講座中野長久教授に深く感謝いたします。また実験上の有益なご助言、親切なご指導をして下さった京都大学総合人間学部環境適応論講座安田浩一朗助手、同大学院医学研究科病態代謝栄養学講座山田祐一郎助教授、井原裕助手、同病態生物医学講座豊國伸哉助教授、大阪府立大学大学院農学研究科生物資源循環工学講座宮武和孝教授、同食品代謝栄養学講座乾博助教授に深く感謝いたします。そして、実験を行うに際し多大なご助力、ご助言をいただきました京都大学大学院人間・環境学研究科環境適応論講座、同医学研究科病態代謝栄養学講座、大阪府立大学大学院農学研究科食品代謝栄養学講座の研究者の方々に心より感謝いたします。

## 参考文献

1. DeFronzo R. A., Simonson D., Ferrannini E. (1982) Hepatic and peripheral insulin resistance : a common feature of type 2 (non-insulin-dependent) and type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* **23**: 313-319
2. Unger R. H., Grundy S. (1985) Hyperglycaemia as an inducer as well as a consequence of impaired islet cell function and insulin resistance : implications for the management of diabetes. *Diabetologia* **28**: 119-121
3. Yki-Javein H. (1990) Acute and chronic effects of hyperglycaemia on glucose metabolism *Diabetologia* **33**: 579-585
4. Levin R. J. (1994) Digestion and absorption of carbohydrates - from molecules and membranes to human. *Am. J. Clin. Nutr.* **59**: 690S-698S
5. Ugolev A. M. (1974) Membrane (contact) digestion. "Biomembrane" 4 A intestinal absorption, Ed. by Smyth D. H. Plenum Press, London, New York pp.285-362
6. Odaka H., Shino A., Ikeda H., Matsuo T. (1992) Antiobesity and antidiabetic actions of a new potent disaccharidase inhibitor in genetically obese-diabetic mice, KK<sub>Ay</sub>. *J. Nutr. Sci. Vitamol.* **38**: 27-37
7. Matsuo T., Odaka H., Ikeda H. (1992) Effect of an intestinal disaccharidase inhibitor (AO-128) on obesity and diabetes. *Am. J. Clin. Nutr.* **55**: 314S-317S
8. Hauri H., Quaroni A., Isselbacher K. (1979) Biosynthesis of intestinal plasma membrane : posttranslational route and cleavage of sucrase-isomaltase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 5183-5189
9. Shapiro G. L., Bulow S. D., Conklin K. A., Scheving L. A., Gray G. M. (1991) Postintestinal processing of sucrase-alpha-dextrinase precursor to authentic subunits : multiple step cleave by tripsin. *Am. J. Physiol.* **24**: G847-G857

10. Hostetter T. H., Rennke H. G., Brenner B. M. (1982) The case for intrarenal hypertension in the initiation and progression of diabetic and other glomerulopathies. *Am. J. Med.* **72**: 375-380
11. Tandon R. K., Srivastava L. M., Pandey S. C. (1975) Increased disaccharidase activity in human diabetics. *Am. J. Clin. Nutr.* **28**: 621-625
12. Younoszai M. K., Schedl H. P. (1972) Effect of diabetes on intestinal disaccharidase activities. *J. Lab. Clin. Med.* **79**: 579-586
13. Olsen W., Korsmo H. (1977) The intestinal brush border membrane in diabetes. *J. Clin. Invest.* **60**: 181-188
14. Hoffmann R., Chang E. (1992) Altered regulation of regional sucrase-isomaltase expression in diabetic rat intestine. *Am. J. Physiol.* **262**: G983-G989
15. Takenoshita M., Yamaji R., Inui H., Miyatake K., Nakano Y. (1998) Suppressive effect of insulin on the synthesis of sucrase-isomaltase complex in small intestinal epithelial cells, and abnormal increase in the complex under diabetic conditions. *Biochem. J.* **329**: 597-600
16. Kawano K., Hirashita T., Mori S., Saitoh Y., Kurosumi M., Natori T. (1992) Spontaneous long term hyperglycemic rat with diabetic complication : Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes* **41**: 1422-1428
17. Dahlqvist A. (1968) Assay of intestinal disaccharidases. *Anal. Biochem.* **22**: 99-107
18. Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
19. Laemmli K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
20. Chmcznski P., Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid

- guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159
21. Chandrasena G., Sunitha I., Lau N., Nanthakumar N., Henning S. (1992) Expression of sucrase-isomaltase mRNA along the villus-crypt axis in the rat small intestine. *Cell. Mol. Biol.* **38**: 243-254
  22. Caspary W. F. (1973) Effect of insulin and experiment diabetes mellitus on the digestive-absorptive function of the small intestine. *Digestion* **9**: 248-263
  23. Miyamoto K., Hase K., Taketani Y., Minami T., Oka T., Nakabou Y. (1991) Diabetes and glucose transporter gene expression in rat small intestine. *Biochem. Biophys Res. Comm.* **181**: 1110-1117
  24. Zoubi S. A., Mayhew T. M., Sparrow R. A. (1995) The small intestine in experimental diabetes : cellular adaptation in crypts and villi at different longitudinal sites. *Virchows Arch.* **426**: 501-507
  25. Takeguchi T., Mori K., Takano S., Akagi M. (1985) Hyperglycemia induces intestinal sucrase activity in subtotally pancreatectomized rats. *Gastroenterol. Jpn.* **20**: 20-27
  26. Hotta K., Kuwajima M., Ono A., Nakajima H., Shingu R., Miyagawa J., Namba M. (1996) Disordered expression of hepatic glycolytic and gluconeogenic enzymes in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats with spontaneous lon-term hyperglycemia. *Biochim. Biophys. Acta* **1289**: 145-149
  27. Sato T., Man. Z., Toide K., Asahi Y. (1997) Plasma membrane content of insulin-regulated glucose transporter in skeletal muscle of the male Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats, a model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett.* **407**: 329-332
  28. Keelan M., Walker K., Rajotte R., Clandinin T. (1987) Diets alter jejunal morphology and brush border membrane composition in streptozotocin-diabetic rats. *Can. J.*

*Physiol. Pharmacol.* **65**: 210-218

29. Debnam E. S., Ebrahim H. Y., Swaine D. J. (1990) Diabetes mellitus and sugar transport across the brush-border and basolateral membranes of rat jejunal enterocytes. *J. Physiol.* **424**: 13-25
30. Zoubi S. A., Mayhew T. M., Sparrow R. A. (1995) The small intestine in experimental diabetes: cellular adaptation in crypts and villi at different longitudinal sites. *Virchows Arch.* **426**: 501-507
31. Fujita Y., Kojima H., Hidaka H., Fujimiya M., Kashiwagi A., Kikkawa R. (1998) Increased intestinal glucose absorption and postprandial hyperglycaemia at the early step of glucose intolerance in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Diabetologia* **41**: 1459-1466
32. Traber P. G., Silberg D. G. (1996) Intestinal-specific gene transcription. *Annu. Rev. Physiol.* **58**: 275-296
33. Traber P. G. (1997) Epithelial cell growth and differentiation V. Transcriptional regulation, development, and neoplasia of the intestinal epithelium. *Am. J. Physiol.* **273**: G979-G981
34. Suh E., Traber P. G. (1996) An intestinal-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 619-625
35. Goto Y., Kakizaki M., Masaki N. (1975) Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal Wistar rats. *Proc. Jap. Acad.* **51**: 80-85
36. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275
37. Hsu S. M., Raine L., Fanger H. (1981) A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am. J. Clin. Pathol.* **75**: 734-738

38. Glisin V., Crkvenjakov R., Byus C. (1974) Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry* **13**: 2633-2637
39. Ullrich A., Shine J., Chirgwin J., (1977) Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences. *Science* **196**: 1313-1319
40. Denhardt D. T. (1966) A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **23**: 641-646
41. Nudel U., Zakut R., Shani M., (1983) The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic  $\beta$ -actin gene. *Nucleic Acid Res.* **6**: 1759-1771
42. Freund J. N. S., Noukamel R., Benazzouz A. (1992) Gradient expression of Cdx along the rat intestine throughout postnatal development. *FEBS Lett.* **314**: 163-166
43. Dunphy J. L., Taylor R. G., Fuller P. J. (1999) Prince Henry's Institute of Medical Research, Clayton Rd., Clayton, Melbourne, Vic 3168, Australia
44. Kanai Y., Lee W. S., You G., Brown D., Hediger M. A. (1994) The human kidney low-affinity Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter SGLT2: Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose. *J. Clin. Invest.* **93**: 397-404
45. Lee W. S., Kanai Y., Wells R. G., Hediger M. A. (1994) The high affinity Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter: Re-evaluation of function and distribution of expression. *J. Biol. Chem.* **269**: 12032-12039
46. Rossetti L., Smith D., Shulman G. I., Papachristou D., Defronzo R. A. (1987) Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats. *J. Clin. Invest.* **79**: 1510-1515
47. Kotyk A. , Kolinsha J., Veres K., Szammer J. (1965) Inhibition by phloretin and phlorizin derivatives of sugar transport in different cells. *Biochem. Zeitschrift.* **342**: 129-138
48. Malathi P., Crane R. K. (1969) Phlorizin hydrolase: a beta-glucosidase of hamster

- intestinal brush border membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* **173**: 245-256
49. Hwang E. S., Hirayama B. A., Wright E. M. (1991) Distribution of the SGLT1 Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter and mRNA along the crypt-villus axis of rabbit small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**: 1208-1217
50. Miyamoto K., Takagi T., Fujii T., Matsubara T., Hase K., Taketani Y., Oka T., Minami H., Nakabou Y. (1992) Role of liver-type transporter (GLUT2) in transport across the basolateral membrane in rat jejunum. *FEBS Lett.* **314**: 466-470
51. Tsujihara K., Hongu M., Saito K., Inamatsu M., Arakawa K., Oku A., Matsumoto M. (1996) Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter inhibitors as antidiabetics. I. Synthesis and pharmacological properties of 4'-dehydroxyphlorizin derivatives based on a new concept. *Chem. Pharm. Bull.* **44**: 1174-1180
52. Hongu M., Tanaka T., Funami N., Saito K., Arakawa K., Matsumoto M., Tsujihara K. (1998) Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter inhibitors as antidiabetics. II. Synthesis and structure-activity relationships of 4'-dehydroxyphlorizin derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **46**: 22-33
53. Dominguez J. H., Camp K., Maianu L., Feister H., Gavey W. T. (1994) Molecular adaptations of GLUT1 and GLUT2 in renal proximal tubules of diabetic rats. *Am. J. Physiol.* **266**: F283-F290
54. Chin E., Zamah A. M., Landau D., Gronbcek H., Flyvbjerg A., Leroith D., Bondy C. A. (1997) Changes in facilitative glucose transporter messenger ribonucleic acid levels in the diabetic rat kidney. *Endocrinology* **138**: 1267-1275
55. You G., Lee W. S., Barros E. J., Kanai Y., Huo T. L., Khawaja S., Wells R. G., Nigam S. K., Hediger M. A. (1995) Molecular characteristics of Na(+)-coupled glucose transporters in adult and embryonic rat kidney. *J. Biol. Chem.* **270**: 29365-29371

56. Thorens B., Sarker H. K., Kaback H. R., Lodish H. F. (1988) Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and  $\beta$ -pancreatic islet cells. *Cell* **55**: 281-290
57. Brichard S. M., Henquin J. C., Girard J. (1993) Phlorizin treatment of diabetic rats partially reverses the abnormal expression of genes involved in hepatic glucose metabolism. *Diabetologia* **36**: 292-298
58. Rasch R. (1984) Tubular lesion in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* **27**: 32-37
59. Holck P., Rasch R. (1993) Structure and localization of glycogen in the diabetic rat kidney. *Diabetes* **42**: 891-900
60. Tsuchitani M., Kuroda J., Nagatani M., Miura K., Katoh T., Saegusa T., Narama I., Itakura C. (1990) Glycogen accumulation in the renal tubular cells of spontaneously occurring diabetic WBN/Kob rats. *J. Comp. Pathol.* **102**: 179-190
61. Cersosimo E., Ajmal M., Naukam R. J., Molina P. E., Abumrad N. N. (1997) Role of the kidney in plasma glucose regulation during hyperglycemia. *Am. J. Physiol.* **272**: E756-E761
62. Debnam E. S., Smith M. W., Sharp P. A., Srai S. K., Turvey A., Keable S. J. (1995) The effects of streptozotocin diabetes on sodium-glucose transporter (SGLT1) expression and function in rat jejunal and ileal villus-attached enterocytes. *Pflugers Arch.* **430**: 151-159
63. Postic C., Burcelin R., Rencurel F., Pegorier J. P., Loizeau M., Girard J., Leturque A. (1993) Evidence for a transient inhibitory effect of insulin on GLUT2 expression in the liver: studies *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. J.* **293**: 119-124